

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[591014710]

1. 変更年月日

1992年 9月 4日

[変更理由]

住所変更

住 所

千葉県千葉市中央区市場町1番1号

氏 名

千葉県

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号 [000160522]

1. 変更年月日 1990年 9月13日
[変更理由] 新規登録
住 所 佐賀県鳥栖市田代大官町408番地
氏 名 久光製薬株式会社

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 0 - 1 3 6 2 6 6
受付番号	5 0 0 0 0 5 7 2 4 7 6
書類名	特許願
担当官	東海 明美 7 0 6 9
作成日	平成 1 2 年 5 月 1 2 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000160522
【住所又は居所】	佐賀県鳥栖市田代大官町 4 0 8 番地
【氏名又は名称】	久光製薬株式会社

【特許出願人】

【識別番号】	591014710
【住所又は居所】	千葉県千葉市中央区市場町 1 番 1 号
【氏名又は名称】	千葉県

【代理人】

申請人	
【識別番号】	100088155
【住所又は居所】	東京都中央区銀座二丁目 6 番 1 2 号 大倉本館 創英国際特許法律事務所
【氏名又は名称】	長谷川 芳樹

【選任した代理人】

【識別番号】	100107191
【住所又は居所】	東京都中央区銀座二丁目 6 番 1 2 号 大倉本館 創英国際特許法律事務所
【氏名又は名称】	長濱 範明

【書類名】 要約書

【要約】

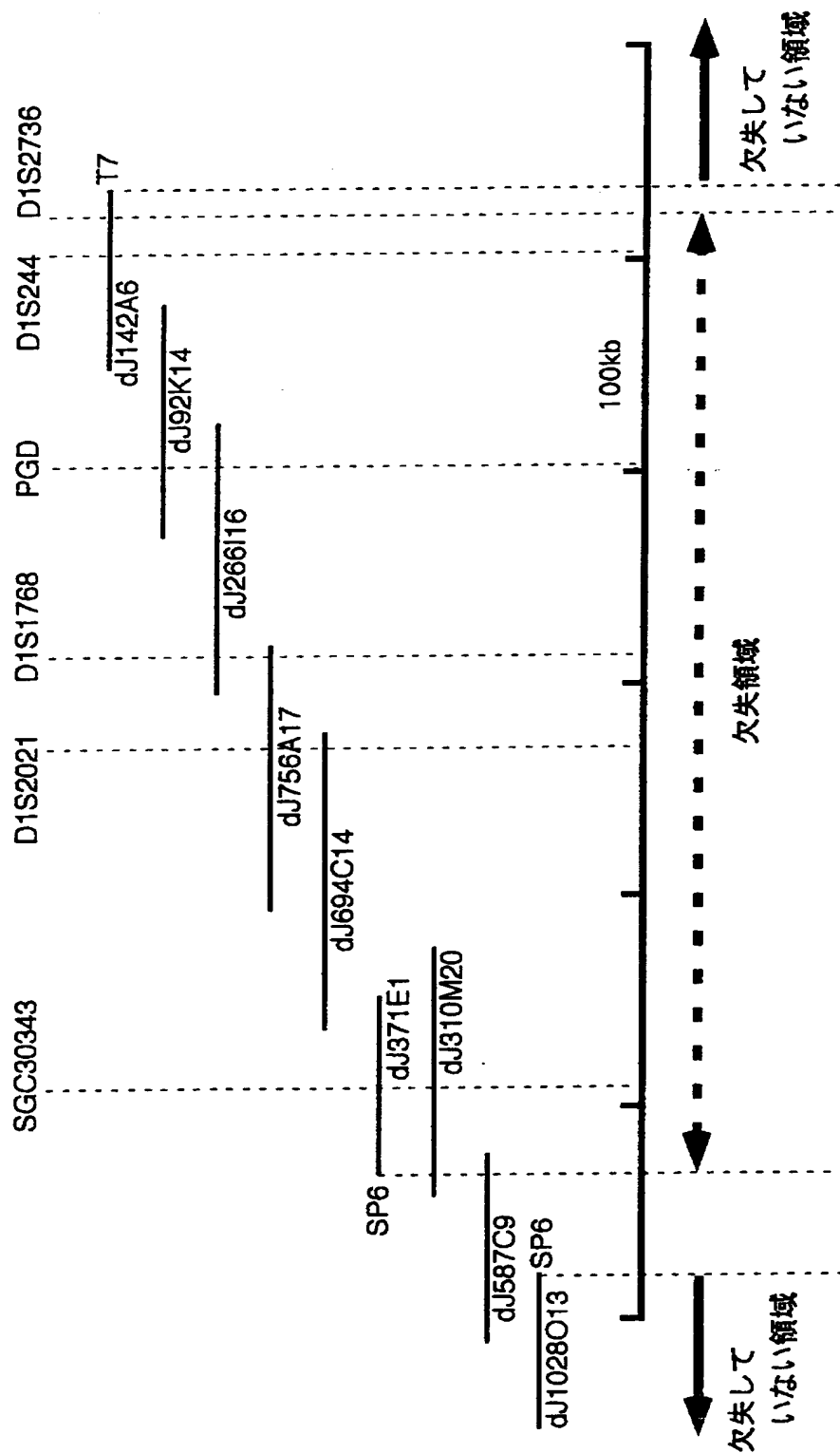
【課題】 神経芽細胞腫の癌抑制遺伝子を提供する。

【解決手段】 ヒト神経芽細胞腫の細胞株であるNB-1、MASS-NB-S
CH-1における第1番染色体短腕36位の欠失領域を見いだした。

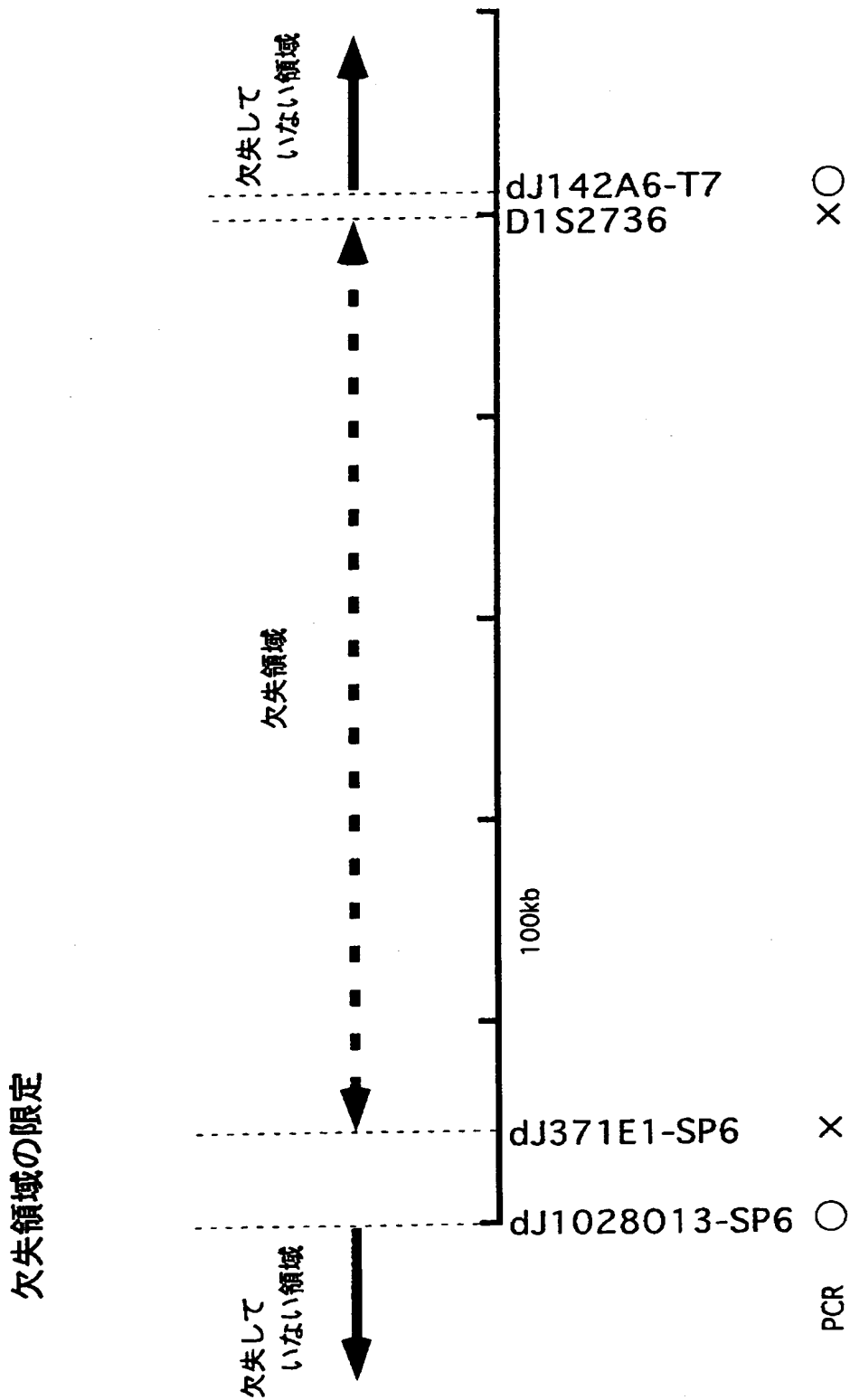
【選択図】 図8

【図 8】

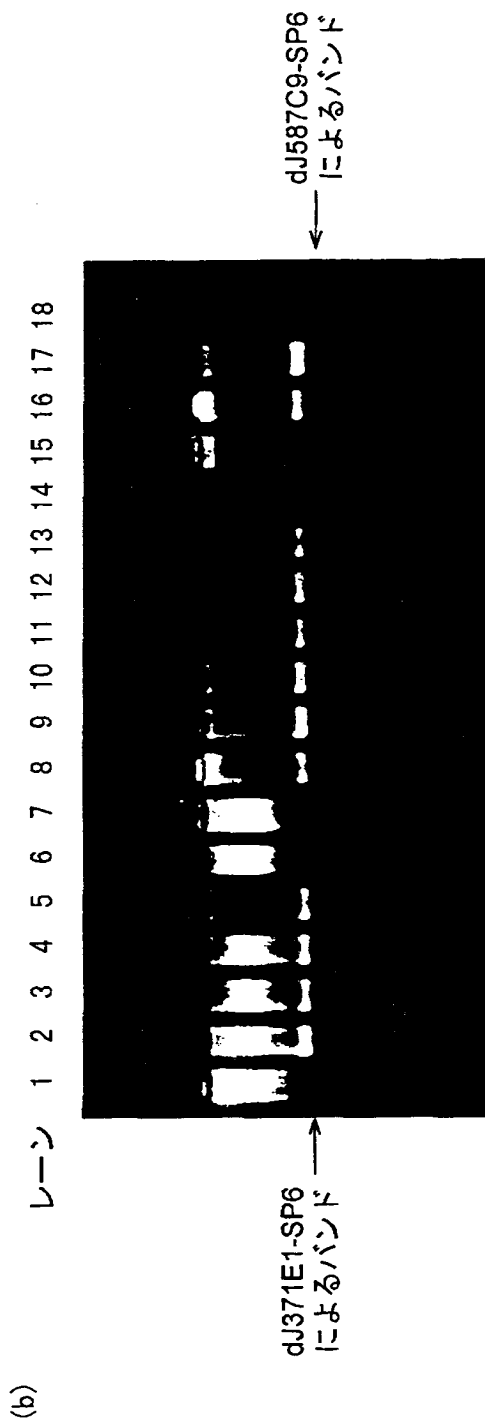
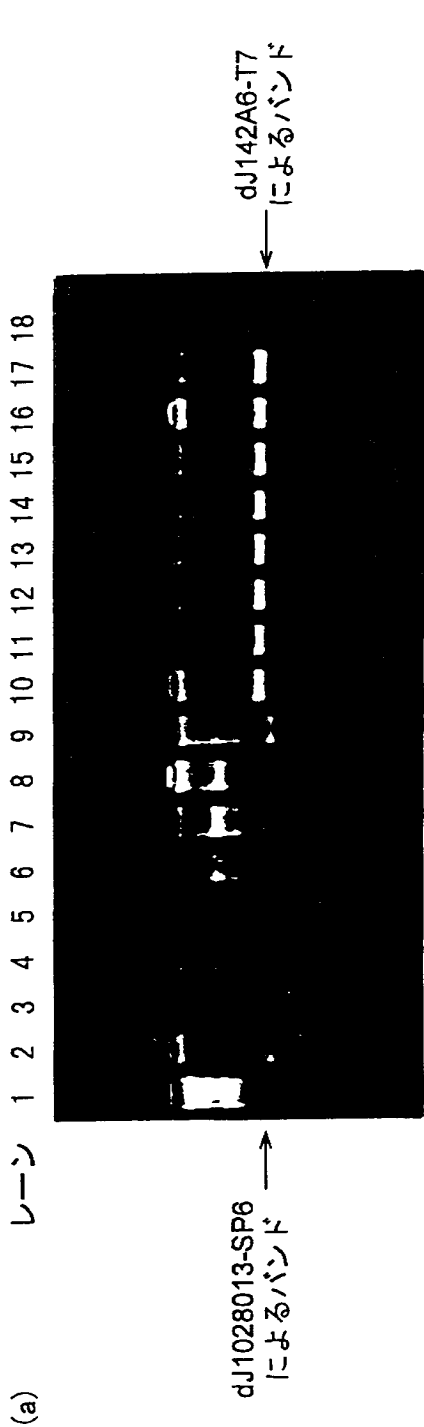
欠失領域を網羅するPACクローン



【図 7】

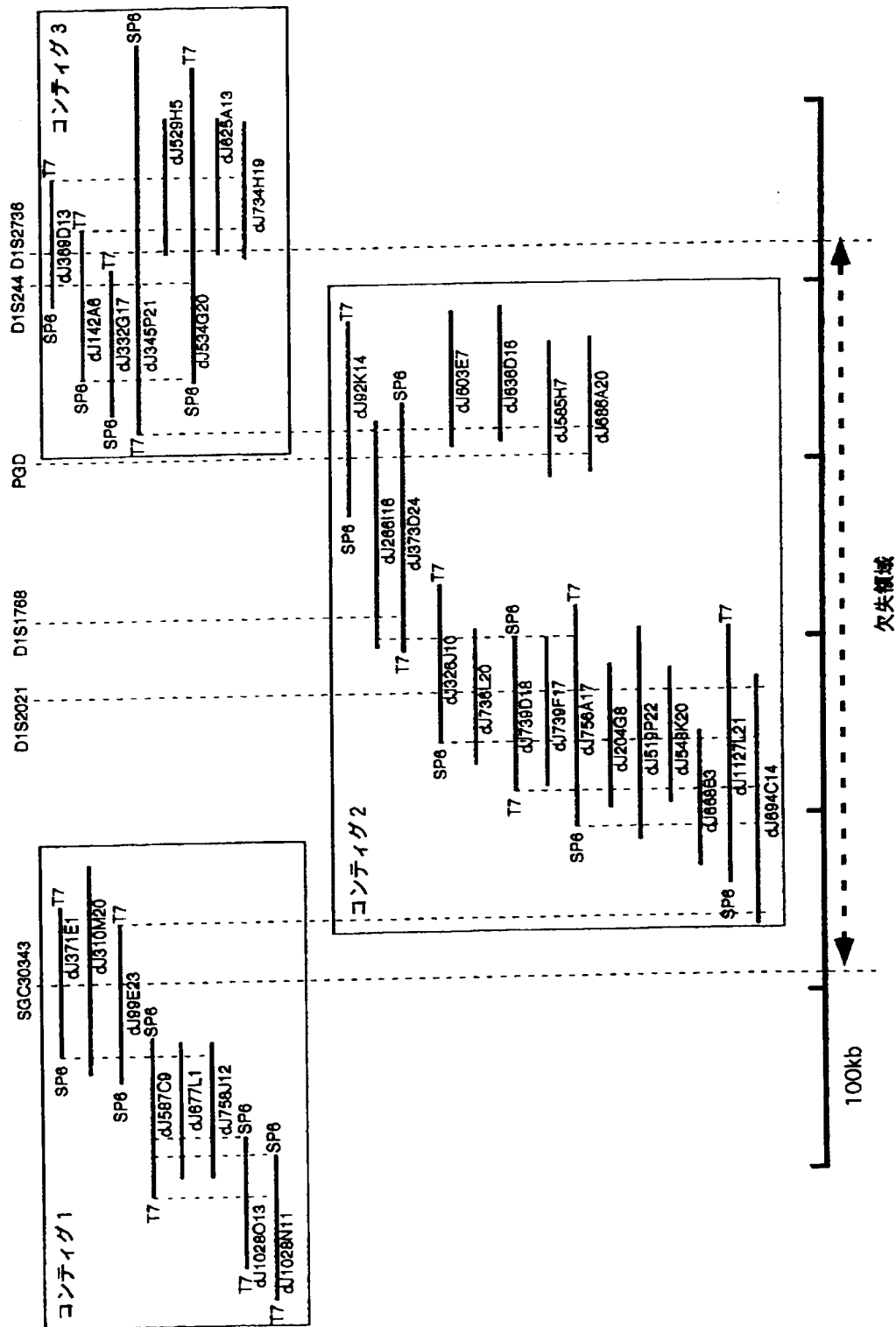


【図 6】



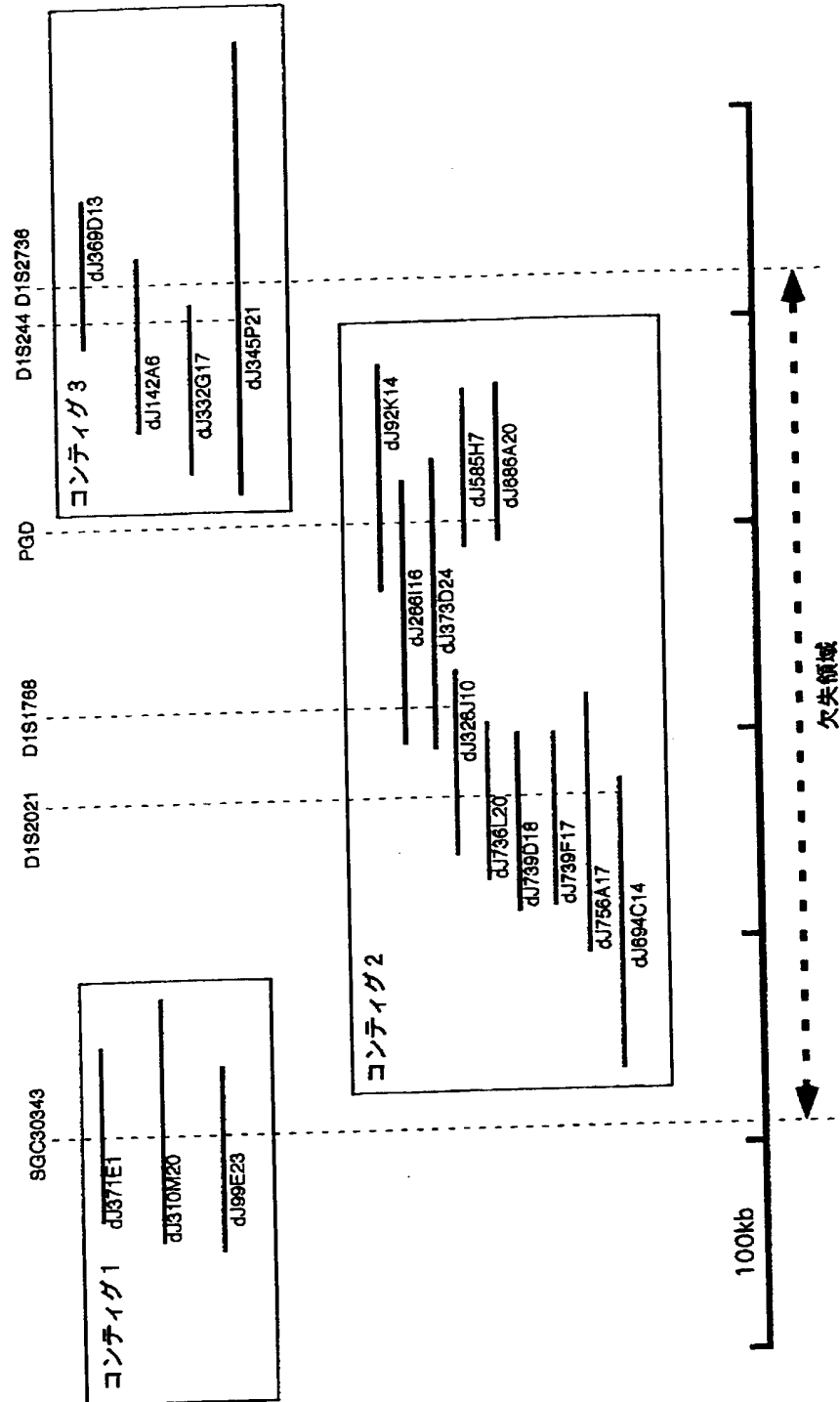
【図 5】

最終的に得られた34のPACクローンとコンテイング

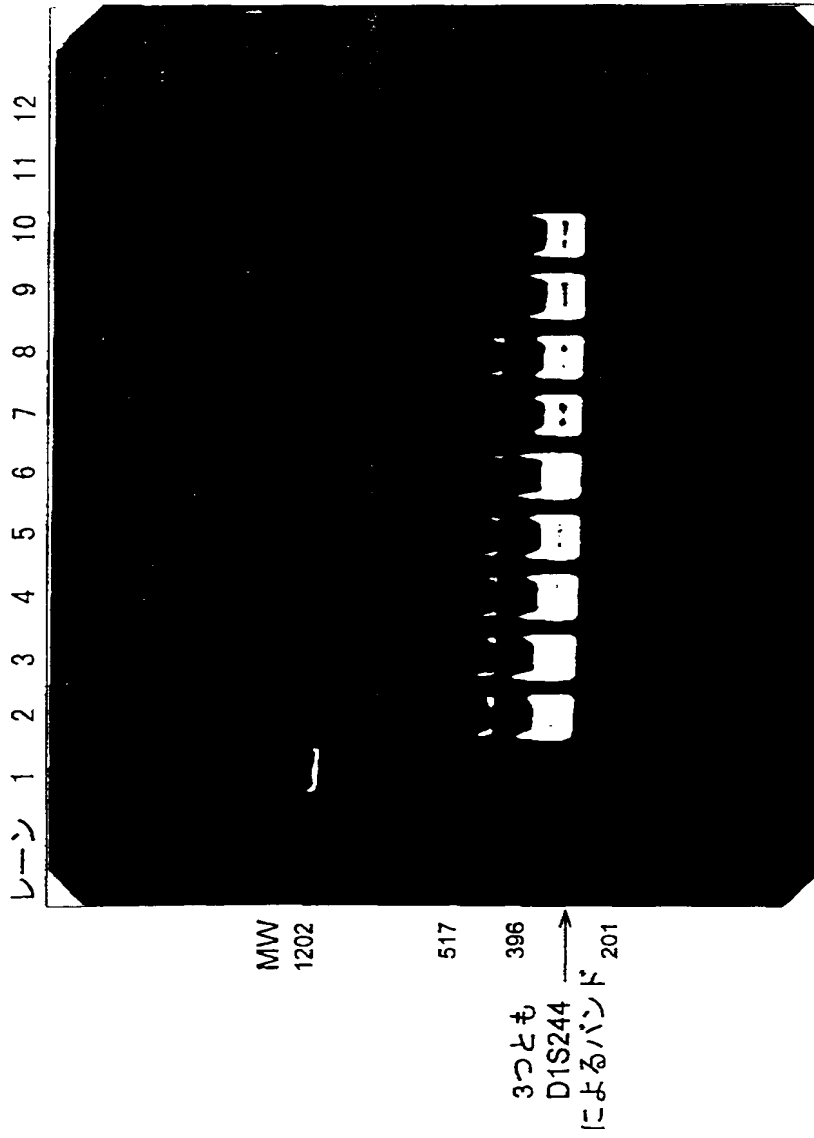


【図4】

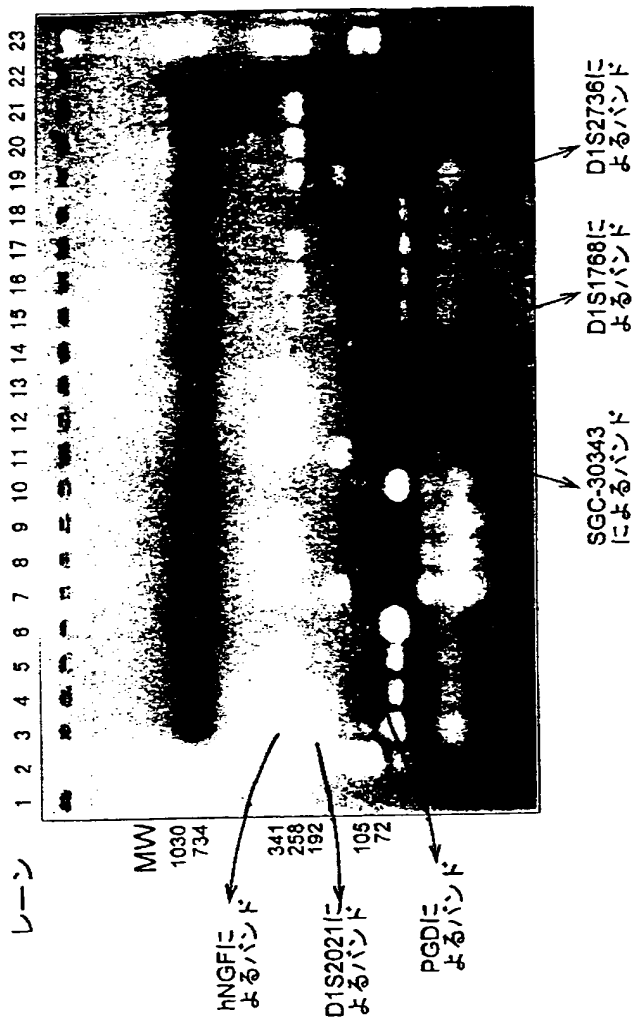
1stスクリーニングによって得られた18のPACクローンとコンティグ



【図 3】

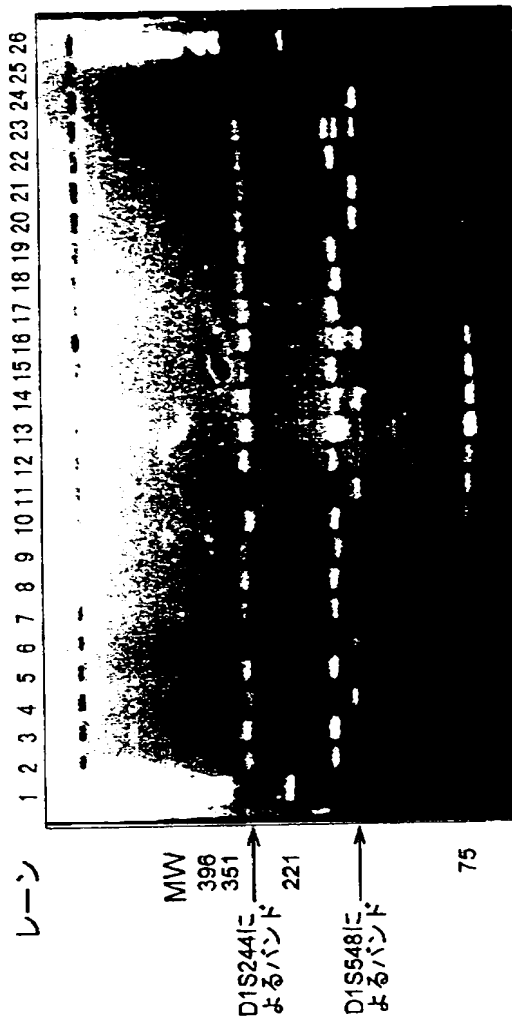


【図 2】



【書類名】 図面

【図 1】



気泳動写真である。ゲルは2.5%アガロースを用いた。ここで、各レーンは以下のとおりである。

レーン1：マーカー（1202bp、517bp、396bp、201bp）

レーン2：陽性対照（ヒト胎盤DNA）

レーン3：1p36に欠損を有さない神経芽細胞腫患者由来の正常細胞

レーン4：1p36に欠損を有さない神経芽細胞腫患者由来の癌細胞

レーン5：MASS-NB-SCH-1患者由来の正常細胞

レーン6：MASS-NB-SCH-1

レーン7：NB1

レーン8：陽性対照（ヒト染色体を有するマウスハイブリドーマ）

レーン9：陽性対照（ヒトリンパ球）

レーン10：陽性対照（ヒト胎盤DNA）

レーン11：1p36に欠損を有さない神経芽細胞腫患者由来の正常細胞

レーン12：1p36に欠損を有さない神経芽細胞腫患者由来の癌細胞

レーン13：MASS-NB-SCH-1患者由来の正常細胞

レーン14：MASS-NB-SCH-1

レーン15：NB1

レーン16：陽性対照（ヒト染色体を有するマウスハイブリドーマ）

レーン17：陽性対照（ヒトリンパ球）

レーン18：空レーン。

また、(a)においては、レーン1～8はプライマーとしてdJ1028013-SP6を用い、レーン9～17はプライマーとしてdJ142A6-T7を用いた。(b)においては、レーン1～8はプライマーとしてdJ371E1-SP6を用い、レーン9～17はプライマーとしてdJ587C9-SP6を用いた。

【図7】 図7は本発明により明らかとなった1p36におけるゲノム欠失領域範囲を示す図である。

【図8】 図8は本発明により明らかとなった1p36におけるゲノム欠失領域範囲に含まれる最小限のPACクロンの位置を示す図である。

泳動写真である。なお全てのPCR反応物は陽性対照としてヒト神経増殖因子 (human Neuro Groth Factor β : hNGF β) 領域を特異的に増幅するプライマーを含んでいる。ここで、レーン1: 空レーン、レーン2: 分子量マーカー (上から1030, 734, 341, 258, 192, 105, 78, 75, 46, 36, 18, 17, 12, 11, 8bp)、レーン3: 陽性対照 (SY5Y)、レーン4: NB-1、レーン5: MASS-NB-SCH-1、レーン6: 陰性対照 (滅菌蒸留水)、レーン7: 陽性対照 (SY5Y)、レーン8: NB-1、レーン9: MASS-NB-SCH-1、レーン10: 陰性対照 (滅菌蒸留水)、レーン11: 陽性対照 (SY5Y)、レーン12: NB-1、レーン13: MASS-NB-SCH-1、レーン14: 陰性対照 (滅菌蒸留水)、レーン15: 陽性対照 (SY5Y)、レーン16: NB-1、レーン17: MASS-NB-SCH-1、レーン18: 陰性対照 (滅菌蒸留水)、レーン19: 陽性対照 (SY5Y)、レーン20: NB-1、レーン21: MASS-NB-SCH-1、レーン22: 陰性対照 (滅菌蒸留水)、レーン23: 分子量マーカー (レーン2と同一) である。

【図3】 図3はD1S244プライマーセットを用いたPACのクローンDNAに対するPCR反応物の5%アクリルアミドによる電気泳動写真である。ここで、レーン1: 分子量マーカー (1202bp, 517bp, 396bp, 201bp)、レーン2~4: dJ142A6、レーン5~7: dJ332G17、レーン8~10: dJ369D13、レーン11: 陽性対照 (ヒト胎盤DNA)、レーン12: 陰性対照 (滅菌蒸留水) である。

【図4】 図4は1stスクリーニングによりNB-1、MASS-NB-SCH-1株において見いだされた1p36に含まれるPAC18クローンのコンティグ図である。

【図5】 図5は最終的にNB-1、MASS-NB-SCH-1株において見いだされた1p36に含まれるPAC34クローンのコンティグを示す図である。

【図6】 図6はPACクローンの情報を元に設計したプライマーを用いたNB-1、MASS-NB-SCH-1ゲノムDNAに対するPCR反応物の電

<400> 59

ggaagatcca agagcaagct tccaagagga caagacagaa gctgtgtatt gcccttttac 60
 agcctaggct tggaagtcac atagtgtcac ttcagcagca gtcacaagcc tgcctggatt 120
 gaaggggaag aaatgcagaa cccgcctcat gctgggaggg aggtcaacgt cactctgtga 180
 gaagatcttc tgggatggga gacgtcgttc tgaccatctt gcaaataaca ttgccacgt 240
 tcctcctctg gcaacaattt acattcttca tatctgcaaa tgatgcctta tttccttccc 300
 gtgagattcc caaacgcgat cccatcaggg catccgcttt caagtccagc atctcattca 360
 ttgaaaattc aagtccagct ggcagatgga ggcttcttca ggatggggat tctttggaac 420
 gtagttcctt tggagtgtta atncttaacg ggatttttaa agatctgtta attgaaaggt 480
 accaagttaa cctacg 496

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1はD1S548、D1S244プライマーセットを用いたヒト神経芽細胞腫ゲノムDNAに対するPCR反応物の4%アガロースゲルによる電気泳動写真である。ここで、レーン1：分子量マーカー（上から1330、828、750、696、536、517、501、396、351、221、75、65、35、22bp）、レーン2：SK-N-BE、レーン3：SK-N-DZ、レーン4：RT-BM1、レーン5：NLF、レーン6：LA-N-5、レーン7：IMR32、レーン8：NMB、レーン9：OAN、レーン10：NGP、レーン11：NB1、レーン12：CHP134、レーン13：KCN、レーン14：NBL-S、レーン15：CHP901、レーン16：SY5Y、レーン17：GANB、レーン18：SK-N-AS、レーン19：KAN、レーン20：LHN、レーン21：SAN、レーン22：TGW、レーン23：陽性対照（ヒトリンパ球）、レーン24：MASS-NB-SCH-1、レーン25：陰性対照（滅菌蒸留水）、レーン26：分子量マーカー（レーン1と同一）である。

【図2】 図2はD1S2021、PGD、SGC-30343、D1S1768、D1S2736プライマーセットを用いたNB-1、MASS-NB-SCH-1ゲノムDNAに対するPCR反応物の2%アガロースゲルによる電気

acagcaagcg ttttcccaca ggtctcgaca cacagaagat a

281

<210> 58

<211> 434

<212> DNA

<213> Homo sapience

<220>

<223> EST

<400> 58

aagaaagcct atattaagca cacattacat taaagtactg ttgacacaca cagtaaagat 60
gagattgcct ttctgcctat ggcaatggct agtccaagtg tgggagcatt gaaggccatt 120
attatagatt tcccttttta gataattctg taattctatg gcaggacat cagctccatg 180
actacacaat cacacattca ctagatagca ccttgittatg ttaccagaat atagccctta 240
gctccaaatc aatgctatat aaacattcta ttctgaagct ttttaaacag aattttcata 300
attactctgc atttttgaga atccttatac ttgacctag cagactgaag gagaacaggg 360
atgagagagg ggaatatgga aaggatacgt tagcagaaag ttcaatgaag ttacttcaaa 420
aagtggaaca aact 434

<210> 59

<211> 496

<212> DNA

<213> Homo sapience

<220>

<223> EST

<220>

<223> EST

<400> 56

aattcgggaac gaggctgaag tggggacaaa taagccccgc cccttctagg tactttgaca 60
 aaaacaggaa cacaataaaa gagcagacct ctggaggctg aggcaggaga atcacttgaa 120
 cccggcatga ggaggttgca gtgagccaag atcatgccac cctactccag cctgggtgac 180
 aaaagcaaga ctcgtctca aaaaaaaaaa aaaaaaaac agatctcaca atgatacagt 240
 cagtctcaca gtggcatctg ttgaagcagt ggatgtcgtc acccaatatt agaatatgtc 300
 ttaaaccaaa ttaaaacttt acttttacac aggagntttt atgggncaca ttgaaagggn 360
 ttcctncctg gtgcccaggg gagcccaaga acttattaga aaggccttca ttggtccatc 420
 catttctgtt cctgtttggg gtcacttggt ggctttgtct ttgacttggt agttgtttct 480
 ctatcttctg tgtctttggt agaa 504

<210> 57

<211> 281

<212> DNA

<213> Homo sapience

<220>

<223> EST

<400> 57

aaaaacaatg tcattttgta cagacaaaat ttagcagact caagcttcca cagttagtgc 60
 gagagcctgt ggatggcata gttacataag agtctgttgt ggattcaa atgtcacctctt 120
 ccaggcagtc tttcctgact taccctggca gctttgtgtt cccacattac tagtaatgtt 180
 ttttccctta atagcaatga tttcactgta ataatgtatt tatatgcctc tctccccag 240

ggcacttctc gcctctgtcc actgctctct gtgggcatcc cagtctacct ggacagtcct 180
 cctgcccacg cagggaagc ctctnacgga ttcccctaata gggcagcatg gggctnggca 240
 gggcaggcca tccagagtga gaccaagcct ncagcaggag agaaggccgg tcgctgggtt 300
 gt 302

<210> 55

<211> 450

<212> DNA

<213> Homo sapience

<220>

<223> EST

<400> 55

nattcggaac agggccagtc ggtgcagcaa acttcaggga agccatgcgc attggagcag 60
 aggtttacca caacctgaag aatgtcatca aggagaaata tgggaaagat gccaccaatg 120
 tnggggatga aggcgggttt gctcccaaca tcctggagaa taaagaaggc ctggagctgc 180
 tgaagactgc tattgggaaa gctggctaca ctgataaggt ggtcatcggc atggacgtag 240
 cggcctccga gtcttcagg tctgggaagt atgacctgga cttcaagtct cccgatgacc 300
 ccagcaggta catctgcct gaccagctgg ctgacctgta caagtccttc atcaaggact 360
 taccagtggt tgtctattcg aagatccctt tgaccagggt gactggggag cttggcagaa 420
 tttnacagcc atgcaggaat tccaggtagt 450

<210> 56

<211> 504

<212> DNA

<213> Homo sapience

<211> 437

<212> DNA

<213> Homo sapience

<220>

<223> EST

<400> 53

gctcgaccag acacaagcat tttgagtaag agagtcagga atatgtctaa catgcaaag 60
 acaagaaacc ccatggccag agtggagaaa gtaaattaag gagtattggc tagatagtgt 120
 aaactttaga atgacagtcc gaggcaagag tttggaactt ttgttgccat ggacctcttt 180
 ggcagtaacg aagccttaga attatgtttt caaatgtgag aaataaagta tttaggatta 240
 caaaggaaac cgataatatt gaaatacagt tgttaaaaca ttaagctctt ctttactgat 300
 gcatgaaata acaagattta gcagttattc taattacat aattccaag tagtgatcaa 360
 tgaaaaagat atcttgcgtc caggcacggt ggctcacgcc tgtaatccca gcactttagg 420
 aggctgagat gggcgga 437

<210> 54

<211> 302

<212> DNA

<213> Homo sapience

<220>

<223> EST

<400> 54

cgtcctcaa gttccctaag cttgccaggg gctgaaaccc agatcaaagc tttttggagg 60
 aatcagcctt ctgaggactt tcctctgcat ctgctcagt ggtggcatct ggaaatnaca 120

ataaattaaa ctttaccaaa ggtatgcaag cataagaaaa acatagtaca tacagagttc 120
 ggtactagcc gaggtttcag gcatccactg gaggtcttgg aacgtctcct ccgtgggttaa 180
 ggcggggact aacgcaccca taatttgcgc catattgcac aaaatgcttc cctccatggc 240
 agctagagtt ctggatggga attaggtacc accaattagg tgcactcatg gacaatttgg 300
 aaagtggaaa tgaggcagag gactgctgtt cttgctgctt ttgatigctg caaatatcag 360
 cagatgggca ggcaggatat tggaaacact gaggtttcct attgtaatgt ccagtctcca 420
 gcttcatggg ggggtcaagag ccaatt 446

<210> 52

<211> 443

<212> DNA

<213> Homo sapience

<220>

<223> EST

<400> 52

ttgaagattt tacattgata agtcacattt acggactcac ctctcaaaaa aatgttaggt 60
 ttttatattt tacggttttc agtatagccg taatcattca agtttaacca ctttacttca 120
 tttgaattaa aaagtcaatg tagtatittt atattaagac atttagtatt ttcagaaagt 180
 attccttata aaagacttgc tcaactgaca acttatagtt agaataaatg actctttaac 240
 cactttttcc cccatagaca aaatgaagta aaatctcagg gaactaacag aggactttat 300
 ttctgatgaa agaggagcag ctatggcttg agactgctaa ccctactcca aacacacaaa 360
 agcagctacc tctctcctgg cccaaatgca cacacaggat gacttagcat ttctagaagg 420
 aagctttgta agatgactgg tgc 443

<210> 53

at

422

<210> 50

<211> 320

<212> DNA

<213> Homo sapience

<220>

<223> EST

<400> 50

gtaagtgggc ccacgtcaca cactggcccc agtgatcgta gcgttgtagg aagcgctgcc 60
 atatttcatt gaatttagcc attctggaat gacgtgttca tgaagtcggc tcttgcat 120
 ccgtggcctt tattattgct aatgcattct gacattacag gtgtagcctt ggctctccca 180
 gaaagggcaa ggctgctctt accaaacgga agagcagaat tcatgatact citacacagt 240
 gaggccagtg ttcaccttta gttactaagc agagtaaggg aaataaatgc ttttatagaa 300
 aagatagcca gtgacagcag 320

<210> 51

<211> 446

<212> DNA

<213> Homo sapience

<220>

<223> EST

<400> 51

gttttaactg ttcaatttta ttattagtta acactgttaa tctcttagtg tacctaactt 60

tcagtgggcc tgggacagtg gctgctcttg actttgtgtg aagggaaatg ccaaggatgc 4800
 ttcttggtgga cticagggga cccaggggtt tggccgtggg ccgtgatggc agcaggcggc 4860
 gggatgcttg tagctcctca cagcaggatt cctgcccact gtttttctc tgttgggagg 4920
 gaagctcttt tctaggagtg tctcagttct gcttttggca ttagtgatgg tgggtggtaca 4980
 gttggaatta gtgcatgtc atacacaaat gttccacaag gcgggagtgt ttcactttct 5040
 ggtgataaac ttgatggta ttgttatgat taagataatg ccgggcaggc cgggcacagt 5100
 ggctcacgcc tgtaatccaa gcacttgggg aggccgaggc gggcagatca cgagatcagg 5160
 agttcaagac cagcctggcc aatgtgatga aaccccgctc ctactaaaaa taaaaatta 5220
 gtcgggtatg gtggcacatg cctgtaattc cagctgcttg ggagcctgag gcaggagaac 5280
 tgcttgaacc caggaggcag aggttgcagt gagccaagat cgcgctattg cactccagcc 5340
 tgggtgacag agcaagactc tgcctcag 5368

<210> 49

<211> 422

<212> DNA

<213> Homo sapience

<220>

<223> EST

<400> 49

aaacagctaa ataatgtggt tatttatiaa agatacatta ataattcttg taattgatgc 60
 aggttttctt ttttctacag actactatta ttttattctt gtctctcttg aaaatgaaaa 120
 atccattagt ttttctcttt tgcttttacc cagaaattaa aggttggtaa gtggttaatta 180
 gcgtagtcct gtcaaagcca gttgcctcat gaggaccgac atttgactta agctgaaata 240
 atggaatatg gctaattgaa agttcattag tcccagctgc tttctttgac attcttttct 300
 tctaccacaa gaacgggcat gccctgccct ctctcactcc tatttttaga cgtattgctg 360
 cgctcctatg tgtctattct acaggctgga ggcacagtgg ttataggga ggtaatggtta 420

agcaggctgg cggccccgtg gagacagcct catccttgag caccagtggg agctggagaa 3060
 gctggagctc ctacatgagg tggaaaaaac ccgccacttt ttgctgctgc gtgagagact 3120
 tggtgacagc atccccaaat ccctgagcga ctcgttatcc ccagcctca gcagtgggac 3180
 cctcagcacc tccaccagta tctcctctca gatctcaacc actaccttg aaagcgccat 3240
 cacacctagc gagagcagt gctatgattc aggagacatc gaaagcctgg tggaccgaga 3300
 gaaagagctg gctaccaagt gcctgcaact tctacccac actttcaaca gagaattcag 3360
 ccaggtgcac ggcagcgtca gtgactgtaa gttgtctgat atctctccaa ttggacggga 3420
 tccctctgag tccagtttca gcagtgccac cctcactccc tctccacct gtccctctct 3480
 ggtagactct aggagcaact ctctggatca gaagacccca gaagccaatt cccgggcctc 3540
 tagtccctgc ccagaatttg aacagtttca gattgtccca gctgtggaaa caccatattt 3600
 ggcccagca ggaaaaaacg aatttctcaa tcttgttcca gatattgaag aaattagacc 3660
 aagctcagt gtcictaaga aaggatacct tcatttcaag gagcctcttt acagtaactg 3720
 ggctaaacat tttgttgcg tccgtcggcc ttatgtcttc atctataaca gtgacaaaga 3780
 ccctgtggag cgtggaaatca ttaacctgtc cacagcacag gtggagtaca gtgaggacca 3840
 gcaggccaatg gtgaagacac caaacacctt tgctgtctgc acaaagcacc gtggggctct 3900
 ttgacaggcc ctcaatgaca aagacatgaa cgactgggtt tatgccttca acccacttct 3960
 agctggcaca atacggtcaa agctttcccg cagatgcccg agccagtcga aatactaagt 4020
 gactctgccg agtgccctca ctgccttctg agagataaag aaagcgttac ctctcatttc 4080
 tctttgtgat tcttgacggt gactcttgta tgtaatcctg tggcttaact acttctccct 4140
 ccttgtccag cacttttcta gctctcccg tccccatctc cattgtctg tactcttttc 4200
 tttttcttg tgctgagaat ctcgttagta gcatgtggcc taacaaaagg aaaaaatgtt 4260
 tttaaacaca cacacacaca cacacacata cacagacaaa aacacaaaaa 4320
 ctctgagggg atctggtgaa tctccaaatt attgtgggtg tactttggct tcttttgta 4380
 tgataggtcc ccatcatgac cacctctgat gtctgtctg ctgtcaccag gcaccttgt 4440
 tttcaagac aacatacttt tttttcttt tctctgttg tgatatcact ttaatttttc 4500
 ttgggtggct tagagactaa gggaggagac atctggcctt tttagaacct gagaggaaaa 4560
 aaagagtctt ttttccct ctgtctcttt ttgccatggc taatccctgc atttccattc 4620
 agggaaaagg tggtagttag catagaactg caacagttat attctgagtc aaagttgggg 4680
 ctttttacgg cataattatg gaattttat ttactggttag agaggagacg agaggctttt 4740

ctgtgtgaac gagcgcttg ccgaccgcac accctcccc actttttcca cggccgattc 1320
 cgacatcact gagctggctg acgagcagca agatgagatg gaggattttg atgatgaggc 1380
 attcgtggat gacgccggct ctgacgcagg gacggaggag ggatcagatc tcttcagtga 1440
 cgggcatgac ccgttttacg accgatcccc ttggttcatt ttagtgggaa gggcatttgt 1500
 ttacctgagc aatctgctgt atcccgtgcc cctgatccac aggggtggcca tcgtcagtga 1560
 gaaaggtgaa gtgcggggat ttctgcgtgt ggctgtacag gccatcgcag cggatgaaga 1620
 agctcctgat tatggctctg gaattcgaca gtcaggaaca gctaaaatat cttttgataa 1680
 tgaatacttt aatcagagtg acttttcgtc tgttgcaatg actcgttctg gtctgtcctt 1740
 ggaggagtig aggattgtgg aaggacaggg tcagagtict gaggicatca ctctccaga 1800
 agaaatcagt cgaattaatg acttggattt gaagtcaagc actttgctgg atggttaagat 1860
 ggtaatggaa gggttttctg aagagattgg caaccacctg aaactgggca gtgccttcac 1920
 tttccgagta acagtgttg aggccagtgg aatcctccca gagtatgcag atatcttctg 1980
 tcagttcaac tttttgcac gccatgatga agcattctcc acggagcccc tcaaaaacaa 2040
 tggcagagga agtcccctgg ctttttatca tgtgcagaat attgcagtgg agatcactga 2100
 atcatttgtg gattacatca aaaccaagcc tattgtattt gaagtctttg ggcattatca 2160
 gcagcaccca cticactctg aaggacagga gcttaacagt ccgcctcagc cgtgccgccg 2220
 attcttccct ccacctatgc cactgtccaa gccagtcca gccaccaagt taaacacgat 2280
 gagcaaaacc agccttggcc agagcatgag caagtatgac ctcttggttt ggtttgagat 2340
 cagtgaactg gagcctacag gagagtatat ccagctgtg gttgaccaca cagcaggctt 2400
 gccttggcag gggacatttt tgcttcatca gggcatccag cgaaggatca cagtgaccat 2460
 tatccatgag aaggggagcg agctccattg gaaagatggt cgtgaactgg tggtaggtcg 2520
 tattcggaat aagcctgagg tggatgaagc tgcagttgat gccatcctct ccctaaatat 2580
 tatttctgcc aagtacctga agtcttccca caactctagc aggaccttct accgctttga 2640
 ggctgtgtgg gatagctctc tgcataactc cttcttctg aaccgagtga caccctatgg 2700
 agaaaagatc tacatgacct tgtcggccta cctagagctg gatcattgca tccagccggc 2760
 tgtcatcacc aaggatgtgt gcatggctct ctactcccga gatgccaaga tctcaccacc 2820
 acgtctctg cgtagcctct ttggcagcgg ctactcaaag tcaccagatt cgaatcgagt 2880
 cactggcatt tacgaactca gcttatgcaa aatgtcagac acaggtagtc caggtatgca 2940
 gagaaggaga agaaaaatct tagatacgtc agtggcatat gtgcggggag aagagaactt 3000

<210> 48

<211> 5368

<212> DNA

<213> Homo sapience

<400> 48

ggaatcagag aagatcattg ctgagttgaa tgaaacttgg gaagagaagc ttcgtaaaac 60
 agaggccatc agaatggaga gagaggcttt gttggctgag atgggagttg ccattcggga 120
 agatggagga accctagggg ttttctcacc taaaaagacc ccacatcttg ttaacctcaa 180
 tgaagacca ctaatgtctg agtgcctact ttattacatc aaagatggaa ttacaagggt 240
 tggccaagca gatgctgagc ggcgccagga catagtgtg agcggggctc acattaaaga 300
 agagcattgt atcttccgga gtgagagaag caacagcggg gaagttatcg tgaccttaga 360
 gccctgtgag cgctcagaaa cctacgtaaa tggcaagagg gtgtcccagc ctgttcagct 420
 gcgctcagga aaccgtatca tcatgggtaa aaacatgtt ttccgcttta accacccgga 480
 acaagcacga gctgagcgag agaagactcc ttctgtgag accccctctg agcctgtgga 540
 ctggacattt gccagaggg agcttctgga aaaacaagga attgatatga aacaagagat 600
 ggagaaaagg ctacaggaaa tggagatctt atacaaaaag gagaaggaag aagcagatct 660
 tcttttgag cagcagagac tggactatga gagtaaattg caggccttgc agaagcaggt 720
 tgaaaccga tctctggctg cagaaacaac tgaagaggag gaagaagagg aagaagttcc 780
 ttggacacag catgaatttg agttggccca atgggccttc cggaaatgga agtctcatca 840
 gtttacttca ttacgggact tactctgggg caatgccgtg tacctaaagg aggccaatgc 900
 catcagtgtg gaactgaaaa agaaggigca gtttcagttt gttctgtga ctgacacact 960
 gtactcccct ttgcctcctg aattacttcc cactgagatg gaaaaaactc atgaggacag 1020
 gcctttccct cgcacagtgg tagcagtaga agtccaggat ttgaagaatg gagcaacaca 1080
 ctatttgtct ttggagaaac tcaagcagag gctggatttg atgcgagaga tgtatgatag 1140
 ggcaggggag atggcctcca gtgcccaaga cgaaagcgaa accactgtga ctggcagcga 1200
 tcccttctat gatcggttcc actggttcaa acttgtgggg agctcccca tttccacgg 1260

ccgaaattcc ctacggagtg cttctttctc accctgcatg ctcaccacct ctctattctg 1620
 cctagttagcc gtcgctatat ccgcagactc cgggctatcc gggagctcaa tagaactgta 1680
 gaagatttga aaaataatga aagccaatgg aaagattccc cactggcaac tagacaccgc 1740
 gaaatgctga agcgctgtaa aactcagctt aagaaactgg tacggtgcaa ggcctgtgct 1800
 gatgctggcc tacttgacga gagcttcctg agaagatgic tgaattttta tggccttctc 1860
 attcagctgc tgctccgcat cctggacccc gcataatccg atataacact gcctttaaat 1920
 tcagatgtcc ccaaggtatt tgcagcgttg cctgagtttt atgtagaaga tgttgcagaa 1980
 tttttatttt ttattgtaca atactctccc caggcgcttt atgagccctg tactcaggat 2040
 attgtgatgt tccttgttgt gatgttgtgc aaccagaact acatccgaaa cccatatttg 2100
 gtggccaaac tggtagaagt catgtttatg accaaccctg ctgttcagcc acgaaccag 2160
 aagttttttg aaatgattga gaaccatcct ctctccacca agttgttggt acctccctg 2220
 atgaagtttt atacagatgt tgagcatacc ggagccacca gtgagtttta tgacaagttc 2280
 acaattcgct atcatattag caccattttt aaaagccttt ggcaaaacat agctcaccat 2340
 ggcaccttta tggaggagtt caactccggg aagcagtttg ttcgctatat aaacatgttg 2400
 ataaacgaca cgacgttttt gctcgaatga agtctggagt ctctgaagcg aatccatgaa 2460
 gtgcaggaag agatgaagaa caaagaacag tgggaccagt tgccccggga tcagcagcag 2520
 gctcgtcagt ctcagcttgc tcaggatgag cgtgtgtccc gctcttacct cgccctggcc 2580
 accgaaaccg tggacatggt ccacatctc acgaagcagg tccagaagcc cttcctcaga 2640
 ccggagcttg gaccccgatt ggctgcaatg ctgaacttta atcttcagca actttgtggc 2700
 cccaagtgcc gtgacctgaa agttgaaaac cctgagaaat acggctttga accaaagaag 2760
 ctgttgacc aactgacgga tatttactta cagctggact gtgctcgggt cgcgaaagcc 2820
 attgctgacg accagagatc ctacagtaag gaattgtttg aagaagttat ttcaaagatg 2880
 cggaaggcag ggatcaaatic cacaatagca atagaaaaat ttaagctgct cgccgagaaa 2940
 gtggaggaga tagtggccaa gaacgcacgc gcagaaatcg actacagcga cgctcctgat 3000
 gagttcagag accctctgat ggacaccctc atgacagacc ccgtgcggct gccctctggc 3060
 accatcatgg accgctccat catcctgcgg cacctgtca actccccac ggaccccttc 3120
 aaccggcaga cgctgacaga gagcatgctg gaaccagtgc cagaactgaa agagcagatt 3180
 caggcgtgga tgagagagaa acagaacagc gatcactaaa ccgttccgcc gccacccctc 3240
 tgctagacac agccaaggcc aacgaggcaa gcagaagcag c 3281

<213> Homo sapience

<400> 47

cgttcccaga gcatggatat cgatggtgtc tcatgtgaga aaagcatgtc ccaggtggat 60
 gtggattcag gaattgaaaa catggagggt gatgaaaatg atcgaagaga aaagcggagc 120
 ctacagtata aggagccttc ctggggccct gaagtgtctg aagagcaggc cttacagctg 180
 gtctgtaaga tcttccgtgt ctcttggaag gaccgggaca gagatgtcat ctttctttct 240
 tctctttctg cacagtttaa gcagaacca aaagaagtat tctccgattt taaggacttg 300
 attggccaga ttttaatgga agtgctaata atgtccactc agaccagaga tgaaaacca 360
 ttgcccagtc tgacagccac atcacagcca attgtgcag cagcacggtc accagacaga 420
 aatctcttgc taaacactgg ctccaatcca ggaacaagcc ccatgttctg cagcgtggct 480
 tcctttggtg ccagctcttt gtctagtttg ggagcctctg gtggagcaag taattgggat 540
 tcctacagt accatttcac cattgaaacc tgcaaagaga cagatatgct gaactacctc 600
 atcgagtgtt tcgaccgagt tggaatagag gaaaaaaaaag caccaaagat gtgcagccag 660
 ccagcagtca gccagcttct gagcaacatc cgctcacagt gcatatcca tactgcttta 720
 gtactacaag gctccctaac acagcccagg tccttgcagc agccgtcctt cctagtgccg 780
 tatatgctgt gtaggaatct cccatatggc ttcatcagg aactggtgag aaccactcac 840
 caggatgaag aagtgttcaa gcagatattt atccccattt tacaaggcct ggctcttgct 900
 gccaaagagt gctccctcga cagtgactac tttaaatacc cctcatggc actaggtgag 960
 ctctgtgaaa ccaagtttgg gaagacacac cctgtgtgca atttggttgc ttctttgcgg 1020
 ttgtggttgc cgaaatcctt aagtcctggc tgtgggcggg agctgcagag actctcttac 1080
 ttaggggctt tctttagctt ctacgtcttt gcagaagatg atgttaaagt ggttgaaaaa 1140
 tacttctcag ggcctgccat taccctggaa aacactcgtg tggttagcca atcattgcag 1200
 cattacttag agctcggag gcaagagctt ttaagattc tgcatagtat ttigttaaata 1260
 ggcgaaaccc gtgaggctgc tctcagttac atggcggctg tcgtcaatgc caatatgaag 1320
 aaagcacaga tgcagacaga tgatagattg gtgtctacag atggatttat gctgaatttc 1380
 ctttgggtac tgcagcagct aagtacaaaa atcaagttag aaacagttga tcccacgtat 1440
 atttttcacc caagatgtcg gattactctt cccaatgatg agacgcgtgt gaatgcaacg 1500
 atggaagatg tgaatgactg gctgactgaa ctctatggcg atcagcctcc attttctgag 1560

tggcccagac agtgactcag ttacagacga cctcgcctc cgtccaggag ctgctgattc 540
 agcagcagca gaagatccag gagcttgccc acgagctggc cgctgccaaag gccaccacat 600
 ccaccaactg gatcctggag tcccagaata tcaacgaact caagtccgaa attaactcct 660
 tgaaagggct tcttttaaatt cggaggcagt tccctccatc cccatcagcc ccgaagatcc 720
 cctcctggca gatcccagtc aagtcaccgt caccctccag cctgcggcc gtgaaccacc 780
 acagcagcag cgacatctca cctgtcagca acgagtcac gtcgtcctcg cctgggaagg 840
 agggccacag ccccgagggc tccacggtca cctaccactt gctgggcccc caggaggaag 900
 gcgagggggt ggtggacgtc aagggccagg tgcggatgga ggtgcaaggc gaggaggaga 960
 agagggagga caaggaggac gaggaggatg aggaggatga tgatgtgagc catgtggacg 1020
 aggaggactg cctgggggtg cagagggagg accgccgggg cggggatggg cagatcaacg 1080
 agcaggtgga gaagctgcgg cggcccgagg gcgccagcaa cgagagttag cgggactagg 1140
 gctgcgcctg ctgcctccag ccctgaggat ggcatctagt gtgcccgtgc gtggccatac 1200
 cctgcctccc tctctggccc tgggagggca gcttggagcc caggtagggg gcagagctgt 1260
 cctcagctgc actgcggcct ggtggcagtg tggggagtica cacttctgtc cacctggcct 1320
 cctctgcct ggccgccagc cccagcccca gccccagccc caggcccagc tgcctttggc 1380
 tttgatctca agtcaggctg aaggcagcga agcctcgggg cccaagcccc tcccagccc 1440
 cctctcccgg acagacgcct tgcccagggt gtgtttgctg agtgtcttga ctaccgtgac 1500
 accacgcatg gccagagcta gcgtccctac tgcctccga ctccctcagt gaggaggagc 1560
 tgcggctcct ctgggtgtctg ccatccccct cctcctctgg gcccgccct ggaccctca 1620
 ggtgcctgtc cccagcccca accccactca tgccccgtcg tcctcccaga caaatgaaac 1680
 cacgctgcgc ttccgatgcc cccgcttgcc gtgtaatggt tcagctaata ccatggcgag 1740
 atgggggctc attccggagg aggagccagg cagcagggcc ttcccgacca acagccagtt 1800
 ttgtccttcc cccagggaaa aaaatgttca tttgtgtgat catgtataga cctcagaacg 1860
 gaagatagga ctgtatataa ttgtaataaa taccagttgc cactattt 1908

<210> 47

<211> 3281

<212> DNA

<400> 45

ggcacgaggc caaacattga tticagggct gccaggaagg aagagcagca gcagggtggg 60
 agagaagctc cagtcagccc acaagatgcc attgtccccc ggcctcctgc tgctgctgct 120
 ctccggggcc acggccaccg ctgccctgcc cctggagggt ggccccaccg gccgagacag 180
 cgagcatatg caggaagcgg caggaataag gaaaagcagc ctctgactt tcctcgcttg 240
 gtggtttgag tggacctccc aggccagtgc cgggccccctc ataggagagg aagcccggga 300
 ggtggccagg cggcaggaag gcgcaccccc ccagcaatcc gcgcgccggg acagaatgcc 360
 ctgcaggaac ttcttctgga agaccttctc ctctgcaaa taaaacctca cccatgaatg 420
 ctcacgcaag tgtaatgaca gacctgaata aaatgtatta agcagcagtg atctttctc 480
 tcctcttcc caagtcattg aaaagtgttt gttatttaaa ttccaataat gcccaatact 540
 gacgtgtctt gagtaatttg gaacccaaaa gtgaagatct ttgataaaga tttttttgt 600
 ggttcgactg gactgtgctg agtgcgggca ctgggctttt cttctgatgt tcattatggt 660
 gctgggaagc tctgtctttg atttaaaata aaatagctaa aggctacac 709

<210> 46

<211> 1908

<212> DNA

<213> Homo sapience

<400> 46

gaaagatggc gtcctcggag caggcagagc agccgagcca gccagctct actccaggaa 60
 gtgaaaatgt gctgcctcga gagccgciga ttgccacggc agtgaagttt ctacagaatt 120
 cccgggtccg ccagagccca ctigcaacca ggagagcatt tctaaagaag aaagggtga 180
 cagatgaaga gattgatatg gccttcacag agtcgggcac tgctgccgat gaccttcgt 240
 ccttggggccc agccacacag gtggttcctg tccagcccc tcacctcata tctcagccat 300
 acagtccccg aggcctccga tggcgagatt acggcgccct ggccatcatc atggcaggca 360
 ttgcatttgg ctttcaccag ctctacaaga aatactgtct cccctcatc ctgggcggcc 420
 gagaggacag aaagcagctg gagaggatgg aggccgtct ctctgagctg agtggcagcg 480

gacacagcca aggccaacga ggcaagcaga agcagcggcc gcagcgaagc tgctgttcat 4080
 gtgttggagg ccaaattgigg caaaccaacc ccaggcccccac ccagagcgag caaacgctga 4140
 gacctgaaag gacatggatg agaagaggag cccgcttcct gtacatatat ttaagtga 4200
 aacacgggtca aaagcittaag ggacagggtt tatggttgct tgtgtaataa agcatgtcct 4260
 tcgtatgtca cagtttgggg caacggaagt cttttagtga tggctaattg gtctgggcag 4320
 catcccttca tgaatttttt tttaatccaa tatccgttga ttgattgtg attagagaac 4380
 ctggacatt ttgctgctaa agaattcttt tccccctctc ccccttcctg accctacttg 4440
 cactgctgtg gatTTTTTTT agagaagcaa aaacaaaagt aaactccttt ccctggccct 4500
 ccaaacatat attctgtgag ataactgtgc ctgctaccaa gtgttaatcc tgggatcgta 4560
 tttttatata atattcacat atttgttttt ttaattgggt ttagatgaca tgattaataa 4620
 aaaaggcaag atattttcag aatttgaatt tcagtttttt ttttcttttg aaatgtccct 4680
 ttaagatttt tttattctaa acaaaaataaa gaaaatcctg ctgctctggt ccttgtgata 4740
 agcctctctt cggcatctga ggagcagctg cagcaaaatc taggggtgta agtgtatcag 4800
 gacttatgtg acttatattt tggggagatg agggttgggt ttttttttaa tgctacgtga 4860
 cagtttgaaa ccttcacagt tatcctctgg gggtaaatca attcttcaac ccttgggtgt 4920
 gtgagtttga ggcagggtca tttgtgtgat gtgtttggcc ttaccaaagc aaaagagggt 4980
 gcaagaatgt gggagtatgt ctgccggttt caacacacac agacaaacac agccacacgc 5040
 gcacacaagt ataagacttt ttgtattact gctccctact taacatactt gaattctcaa 5100
 atttcccttg gggtaaaaaa aaaaaaagga ttgaaacca taaagtgttc tgaagaaatt 5160
 aagtctataa aaagcatact ttcttttttc ttttcccttt tccccccac agacaatgtc 5220
 ctctgttcaa ttcctaacgc aaactacaat aaatggtgac acacgttcag aagaaaaaaa 5280
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 5314

<210> 45

<211> 709

<212> DNA

<213> Homo sapience

agatgtgaat gactggctga ctgaactcta tggcgatcag cctccatttt ctgagccgaa 2340
 attccctacg gagtgcctt tctcaccct gcatgctcac cacctctcta ttctgcctag 2400
 ttgccgtcgc tatatccgca gactccgggc tatccgggag ctcaatagaa ctgtagaaga 2460
 tttgaaaaat aatgaaagcc aatggaaaga ttccccactg gcaactagac accgcgaaat 2520
 gctgaagcgc tgtaaaactc agcttaagaa actggtacgg tgcaaggcct gtgctgatgc 2580
 tggcctactt gacgagagct tcctgagaag atgtctgaat ttttatggcc ttctcattca 2640
 gctgctgctc cgcaccttgg accccgcata tcccgatata acactgcctt taaattcaga 2700
 tgtccccaag gtatttgcag cgttgcctga gttttatgta gaagatgttg cagaattttt 2760
 attttttatt gtacaatact ctccccaggc gccttatgag ccctgtactc aggatattgt 2820
 gatgttcctt gttgtgatgt tgtgcaacca gaactacatc cgaaacccat atttggtggc 2880
 caaactggta gaagtcattt ttatgaccaa ccctgctgtt cagccacgaa cccagaagtt 2940
 ttttgaaatg attgagaacc atcctctctc caccaagttg ttggtacctt ccctgatgaa 3000
 gttttataca gatgttgagc ataccggagc caccagcgag ttttatgaca agttcacaat 3060
 tcgctatcat attagcacca tttttaaaag cctttggcaa aacatagctc accatggcac 3120
 ctttatggag gatttcaact ccgggaagca gtttgttcgc tatataaaca tgttgataaa 3180
 cgacacgacg tttttgctcg atgaaagtct ggagtctctg aagcgaatcc atgaagtgca 3240
 ggaagagatg aagaacaaag aacagtggga ccagttgccc cgggatcagc agcaggctcg 3300
 tcagtctcag ctgtctcagg atgagcgtgt gtcccgctct tacctcgccc tggccaccga 3360
 aaccgtggac atgttcaca tcctcacgaa gcaggtccag aagcccttcc tcagaccgga 3420
 gcttggaccc cgattggctg caatgctgaa ctttaattct cagcaacttt gtggcccaaa 3480
 gtgccgtgac ctgaaagttg aaaaccctga gaaatacggc tttgaaccaa agaagctgtt 3540
 ggaccaactg acggatattt acttacagct ggactgtgct cggttcgcga aagccattgc 3600
 tgacgaccag agatcctaca gtaaggaatt gtttgaagaa gttatttcaa agatgcggaa 3660
 ggcagggatc aaatccacaa tagcaataga aaaatttaag ctgctcgccg agaaagtgga 3720
 ggagatagtg gccagaacg cacgcgcaga aatcgactac agcgacgctc ctgatgagtt 3780
 cagagaccct ctgatggaca cctcatgac agaccccggt cggctgccct ctggcaccat 3840
 catggaccgc tccatcatcc tgcggcacct gctcaactcc cccacggacc cttcaaccg 3900
 gcagacgctg acagagagca tgctggaacc agtgccagaa ctgaaagagc agattcaggc 3960
 gtggatgaga gagaacaga acagcgatca ctaaaccgtt ccgccgcca ccctctgcta 4020

agtgtctgaa gagcaggcct tacagctggc ctgtaagatc ttccgtgtct cttggaagga 600
 ccgggacaga gatgtcatct ttctttcttc tctttctgca cagtttaagc agaaccctaaa 660
 agaagtattc tccgatttta aggacttgat tggccagatt ttaatggaag tgctaagtat 720
 gtccactcag accagagatg aaaaccatt tggcagctcg acagccacat cacagccaat 780
 tgctgcagca gcacgggtcac cagacagaaa tctcttgcta aacactggct ccaatccagg 840
 aacaagcccc atgttctgca gcgtggcttc ctttgggtgcc agctctttgt cttagcctcta 900
 tgaaagtagt ccggctccca ctcccagttt ctggagctct gtccccgtga tgggcccgtc 960
 tcttgccctca ccttcccgtg cagccagcca gttggctgtg ccttccactc ccttcagtcc 1020
 tcacagtgcg gcctctggaa ctgctgcggg aagccagcct tcatccccgc ggtatcgccc 1080
 ctacactgtc actcaccat gggcgtctc aggcgtctcc attctgtcga gctccccaag 1140
 tccccctgcc ctgccagta gcccccaagc agtgcccgcc agcagttcca gacagaggcc 1200
 cagcagcagc ggtccacccc taccaccgc ctcaccagt gccacgagca gacgcccctc 1260
 ctccctgagg atctctccta gtttgggagc ctctgggtgga gcaagtaatt gggattccta 1320
 cagtgacat ttaccattg aaacctgcaa agagacagat atgctgaact acctcatcga 1380
 gtgtttcgac cgagtiggaa tagaggaaaa aaaagcacca aagatgtgca gccagccagc 1440
 agtcagccag ctctgagca acatccgtc acagtgcata tcccatactg ctttagtact 1500
 acaaggctcc ctaacacagc ccaggctctt gcagcagccg tcttccctag tgccgtatat 1560
 gctgtgtagg aatctcccat atggcttcat tcaggaactg gtgagaacca ctaccagga 1620
 tgaagaagtg ttcaagcaga tatttatccc cattttaca ggccctggctc ttgttgccaa 1680
 agagtgtccc ctgcacagt actacttta atacccttc atggcactag gtgagctctg 1740
 tgaaaccaag ttgggaaga cacacctgt gtgcaattg gttgcttctt tgcggttgtg 1800
 gttgccgaaa tcttaagtc ctggctgtgg gcgggagctg cagagactct ctacttagg 1860
 ggctttcttt agcttctcag tctttgcaga agatgatgtt aaagtgggtg aaaaatactt 1920
 cttagggcct gccattaccc tggaaaacac tcgtgtggtt agccaatcat tgcagcatta 1980
 cttagagctc ggaaggcaag agcttttta gattctgcat agtattttgt taaatggcga 2040
 aaccctgag gctgctctca gttacatggc ggctgtcgtc aatgccaata tgaagaaagc 2100
 acagatgcag acagatgata gattgggtgc tacagatgga tttatgctga atttctttg 2160
 ggtactgcag cagctaagta caaaaatcaa gttagaaaca gttgatccca cgtatatatt 2220
 tcaccaaga tgtcggatta ctcttcccaa tgatgagacg cgtgtgaatg caacgatgga 2280

<210> 43
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 43
 tttttgaggt gtgagagcag

20

<210> 44
 <211> 5314
 <212> DNA
 <213> Homo sapience

<400> 44
 gaattcccct gctctccttc ctaccctttg gtctcgagaa cagaaggatc tctccttaac 60
 gcctttcacc attaagagga aagcgatgga ggagctgagc gctgatgaga ttcgacggag 120
 gcgccttgca cgacttgctg gtggacagac ctctcagcca accacccac tcacctctcc 180
 ccagagggag aacctccgg ggcctcccat agcggcatca gcccaggac cctctcagag 240
 tcttggtctc aatgtccaca acatgacccc agctacctcc ccaatagggtg catcaggagt 300
 agcccatcga agccagagca gtgaaggagt cagtctctc agcagctcgc cctctaatag 360
 ccttgaaacg caatctcagt ctctctcagc ttcccagagc atggatatcg atgggtgtctc 420
 atgtgagaaa agcatgtccc aggtggatgt ggattcagga attgaaaaca tggaggttga 480
 tgaaaatgat cgaagagaaa agcggagcct cagtgataag gagccttcct cgggcccctga 540

<220>

<223> PCR primer

<400> 40

tttcctgcgt gtggcctc

18

<210> 41

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 41

ttttccgtct ttccacac

18

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 42

tttttgaggt gtgagagcag

20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 38

ttccagttga tcagagtgcg

20

<210> 39

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 39

ttgaccgtgt ttgtcactta aa

22

<210> 40

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 35

tctggacgta ctctgttc

18

<210> 36

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 36

gtgttcctca tatggcca

18

<210> 37

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 37

tgggagtatg tctgccgg

18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 33

tggttagag gctttgc

18

<210> 34

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 34

tagctgaagc aatctatt

18

<210> 35

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

gtgaagagcc agagatgtcc

20

<210> 31

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 31

gtgactgcgt gattgcat

18

<210> 32

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 32

gtgttgagg ccaaattg

19

<210> 33

<211> 18

<220>

<223> PCR primer

<400> 28

gcctctttgt tgcagtgatt

20

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 29

gcgttaggaa ttgaacag

18

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 30

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 26

gagcagcacc gtacaaat

18

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 27

gaggactagt gtcagaaa

18

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> PCR primer

<400> 23

ctgggcaagc taattttg

18

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 24

ctgggcaagc taattttg

18

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 25

gaactcattg gcaaaaggaa

20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 21

ctgcttcgga ggtcagcc

18

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 22

ctgcttcgga ggtcagcc

18

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<400> 18

cctccagggt attcttgg

18

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 19

cggccttaaa atctgata

18

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 20

ctcaatactg gatctgtg

18

<210> 21

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 16

ccacctccaa atcctgac

18

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 17

ccctcaccca cacttcac

18

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 14

atgaatggga caaacttc

18

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 15

catagtgcc acacgcaaag

20

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

atacataaga taagaatc

18

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 12

atattgcaga ctgaacag

18

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 13

atctgatgtt tggagcttga g

21

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 9

agtatgctgt gtgtccag

18

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 10

agtatggcag acttgatg

18

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

acttggagga tttatttg

18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 7

agctccgctc cctgtaat

18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 8

agtagacacg ggtatcag

18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

accaggagct gctcatgtg

19

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 5

actaacagct ccgtgacgc

19

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

aaacccctct tcttagagtg acg

23

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 2

aaacctcagc agtggtcctg

20

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 3

aagcagtttt ccccataa

18

<210> 4

<211> 19

【 0 0 7 6 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc.

<120> Human 1p36 Homozygous Deletion Region

<130> JP00-0676-HM

<140>

<141>

<150> JP 11/245962

<151> 1999-08-31

<160> 59

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 1

いる。Nakagawara A. 等 Cancer Res. 52, 1364-1368 (1992), Nakagawara A. 等 N. Engl. J. Med. 328, 847-854 (1993) を参照。

【0072】

実際、小児神経芽細胞腫の患者157症例で1p36におけるLOHの有無をtrk遺伝子の発現の強度と比較して調べたところ、1p36にLOHが存在する患者42症例中、trk高発現の患者が24例、低発現の患者は18例となった。逆に1p36にLOHが存在しない患者では115例中、trk高発現の患者が36症例、低発現の患者は79例となった。1p36におけるLOHの有無とtrk発現の間に良い相関が得られた。

【0073】

同様に、発症年齢が高い患者(Nakagawara A. 等 Med. Pediatr. Oncol. 31, 113-115 (1998))、原発巣が副腎である患者(Nakagawara A. 等 Surgery 104, 34-40 (1988))、及び癌遺伝子であるN-mycが高発現している患者も(Brodeur GM. 等 Science 224, 1121-1124 (1984)) も一般的に予後不良であるといわれているが、1p36におけるLOHの有無との相関が非常に安定して得られた。

【0074】

以上のことから1p36におけるLOHの有無が予後と同定する優れたマーカーであることが明らかになった。

【0075】

【発明の効果】

以上、本発明に従いヒト神経芽細胞腫の第1番染色体短腕36位に共通に存在するホモ接合性欠失領域を同定した。得られた欠失領域の塩基配列の情報に基づき、腫瘍の診断、予後同定の方法およびそのために使用可能な腫瘍マーカーを設計することが可能となり、さらに、該領域の塩基配列に基づき、腫瘍の遺伝子診断方法、抗癌剤の開発、腫瘍病体メカニズムの解析方法、腫瘍病体メカニズムの解析に用いる試薬の開発も可能となる。

(実施例 8) 欠失領域に含まれる塩基配列に基づく、ヒト神経芽細胞腫の予後に関する診断

小児神経芽細胞腫の患者の細胞を用い、今回明らかになった 1 p 3 6 における LOH の有無と癌の予後に関する種々のファクターとの相関を検討した。その結果を表 8 に示す。

【0070】

【表 8】

1p36のLOHを用いたヒト神経芽細胞腫の予後の同定

(a) 患者の年齢との相関 : $p=0.008$

	LOH有り	LOH無し	計
1歳未満	23	103	126
1歳以上	27	51	78
計	50	154	204

(b) 原発巣との相関 : $p=0.000$

	LOH有り	LOH無し	計
副腎	42	81	123
副腎以外	8	78	85
計	50	159	209

(c) trkA発現レベルとの相関 : $p=0.003$

	LOH有り	LOH無し	計
trkA高発現	24	36	60
trkA低発現	18	79	97
計	42	115	157

(d) N-mycの有無との相関 : $p=0.000$

	LOH有り	LOH無し	計
N-myc有り	17	3	180
N-myc無し	31	149	20
計	48	152	200

【0071】

一般的に癌遺伝子である *trkA* が高発現している患者は予後が不良とされて

【表7】

表7: 欠失領域の塩基配列情報

遺伝子	名称または登録番号	定義および特徴	ORF (bp)	配列番号
1	UFD2(AF043117)	ubiquitin-fusion degradation protein 2	3909	44
2	KIF1B β	kinesin-like protein KIF1B		
3	CORT(NM001302)	preprocortistatin	318	45
4	PEX-14(AB017546)	ペルオキシソーム膜タンパク		46
5	KIAA0684(AB014584)	Homo sapiens clone 686 protein (KIAA0684) mRNA.	5312	47
6	KIAA0591(AB011163)	Homo sapiens mRNA for KIAA0591 protein, partial cds.	5368	48
7	AI080353(EST)	ox80f04.s1 Soares NhHMPu S1 Homo sapiens cDNA clone	422	49
8	D79099(EST)	HUM531D06B Human placenta polyA+ (TFujiwara) Homo sapiens cDNA clone	320	50
9	AA059029(EST)	zf63h02.s1 Soares retina N2b4HR Homo sapiens cDNA clone	446	51
10	AA628589(EST)	af39g05.s1 Soares total fetus Nb2HF8 9w Homo sapiens cDNA clone	443	52
11	AA728950(EST)	nw02c08.s1 NCI CGAP Pr16 Homo sapiens cDNA clone	437	53
12	AA328945(EST)	EST32514 Embryo, 12 week I Homo sapiens cDNA 5' end, mRNA sequence	302	54
13	R89689(EST)	ym99c01.r1 Soares adult brain N2b4HB55Y Homo sapiens cDNA clone	450	55
14	AA018367(EST)	ze41e05.r1 Soares retina N2b4HR Homo sapiens cDNA clone	504	56
15	Z19845(EST)	HSAAAAUKT H, Human adult Brain Cortex tissue Homo sapiens cDNA	281	57
16	AI050021(EST)	an22d04.x1 Gessler Wilms tumor Homo sapiens cDNA clone	434	58
17	R67760(EST)	yi26f03.r1 Soares placenta Nb2HP Homo sapiens cDNA clone	496	59

【0069】

ーベース（3万個以上の染色体別にマッピングされた遺伝子、EST等のヒトゲノム情報が登録されているデータベース：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap99/>）を、先の実施例で用いたプライマーD1S244等をキーワードとして検索すると、数々の遺伝子およびESTがヒットした。また、ゲノムシーケンスの一部についてインターネット[N C B IのBLAST (National Center of Biotechnology Information USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)]を介したDNA配列のホモロジー検索を行った結果、ESTの一部が判明した。これらの配列に関する情報を表7に示し、塩基配列が登録されているものについては、配列表に記載した。

【0068】

【表 6】

D1S2736、dJ1028013-SP6、dJ371E1-SP6、dJ142A6-T7のシーケンス

プライマーセット	シーケンス(F) 5'-3' (配列番号)	シーケンス(R) 5'-3' (配列番号)
D1S2736	CCTCCAGGGTATTCTTGG (18)	TTTTGAGGTGTGAGAGCAG (43)
dJ1028013-SP6	GTGTTCTCATATGTCA (36)	TGGTTTAGAGGCTTTTC (33)
dJ371E1-SP6	CTGCTTCGGAGGTCAGCC (22)	GTGACTGCGTGATTGCAT (31)
dJ142A6-T7	CTGGCAAGCTAATTTTG (24)	TCTGGACGTACTCTGTTTC (35)

【0067】

(実施例 7) 1 p 3 6 ホモ接合性欠失領域の塩基配列情報

欠失領域の塩基配列情報を得る目的で、インターネットの遺伝子マップデータ

1 3 の S P 6 側 プライマーセットと P A C クローンである d J 3 7 1 E 1 の S P 6 側 プライマーセットとの間からプライマーセット D 1 S 2 7 3 6 と P A C クローンはである d J 1 4 2 A 6 の T 7 側 プライマーセットとの間で規定される 1 p 3 6 におけるゲノム欠失領域の範囲が得られた。

【 0 0 6 4 】

この欠失領域を全て網羅する最小限の P A C クローン群を図 8 に示す。これらの P A C クローンをシーケンスすることで N B - 1 、 M A S S - N B - S C H - 1 の欠失領域中に含まれる塩基配列が決定される。

【 0 0 6 5 】

なお、表 6 は本発明により明らかとなった 1 p 3 6 におけるゲノム欠失領域範囲を決定したプライマーセットのシーケンスを示す表である。

【 0 0 6 6 】

2nd、3rdスクリーニングに用いたウォーキングプライマーのシークエンスを表4に示す。最終的に34クローンのPACからなる1つのコンティグが得られた。得られた結果を図5に示す。

【0059】

(実施例6) NB-1及びMASS-NB-SCH-1株の1p36におけるゲノム欠失部位の特定

実施例4により、NB-1及びMASS-NB-SCH-1は1p36の少なくともSGC-30343からDIS2736で規定される領域に両染色体の欠失を有するものと判断したが、欠失領域の両末端を特定するために以下の操作を行った。

【0060】

実施例5により得られたPACクローンによるコンティグ情報から欠失領域付近に新たにプライマーを合成し、NB-1及びMASS-NB-SCH-1株と陽性コントロールのPCRを以下の条件で行い、特異的バンドの増幅の有無を調べた。LA PCR kit (宝酒造社製)を用いて以下の方法でPCRを行った。

【0061】

1 μ lのゲノムDNA溶液(100ng/ μ l)、1 μ lの10xLA PCR buffer、0.6 μ lのdNTPs(2.5mM:キット付属品)、0.1 μ lのプライマーF(100mM)、0.1 μ lのプライマーR(100mM)、7.15 μ lの滅菌蒸留水、および0.05 μ lのLA Taq(5u/ μ l:キット付属品)を混合し10 μ lの混合液を調製した。混合液を95℃で2分間変性させた後、95℃で30秒間、58℃で1分間を1サイクルとして30サイクル繰り返しPCR反応を行った。

【0062】

このPCR反応物を2.5%のアガロースゲルを用いて電気泳動した。得られた結果を図6に示す。

【0063】

これらの結果により、図7に示すようなPACクローンであるdJ10280

【表 5】

2nd、3rdスクリーニングにより得られたPACクローン
太字は複数のプライマーにより検出されたクローン

2nd	プライマーセット	新たに得られたPACクローン	コンティグ
	DJ99E23-T7	dJ694C14	1
	DJ371E1-SP6	dJ587C9、dJ677L1、dJ758J12	
	DJ326J10-SP6	dJ204G8、dJ519P22、dJ548K20、dJ668B3、dJ1127L21、dJ694C14	2
	DJ739D18-SP6	-	
	DJ756A17-SP6	dJ519P22、dJ668B3、dJ1127L21	
	DJ373D24-SP6	dJ332G17、dJ345P21、dJ603E7、dJ636D16、dJ585H7、dJ686A20	
	DJ369D13-T7	dJ529H5、dJ534G20、dJ625A13、dJ734H19	3
	DJ142A6-SP6	-	
	DJ142A6-T7	dJ534G20	
	DJ345P21-T7	dJ603E7、dJ636D16	

3rd	プライマーセット	新たに得られたPACクローン	コンティグ
	DJ587C9-T7	dJ1028O13、dJ1028N11	1

P C RによるP A Cクローンを選抜し、同様に、選抜されたクローンの両末端シーケンスによるウォーキングプライマーの設計、ウォーキングによるコンティグの決定のプロセスを繰り返した。これを2 n d、3 r dスクリーニングとした。表5に選抜したクローンとそれぞれのプライマーセットのシーケンスを示す。

【 0 0 5 7 】

【表 4】

2nd、3rdスクリーニングで使用したプライマーセットのシーケンス

2nd

コンティグ	PACクローン	プライマーセット	シーケンス(F) 5'-3' (配列番号)	シーケンス(R) 5'-3' (配列番号)
1	dJ99E23	dJ99E23-T7	GCGTTAGGAATTGAACAG (29)	TGGGAGTATGTCTGCCGG (37)
	dJ371E1	dJ371E1-SP6	CTGCTTCGGAGGTCAGCC (21)	GTGACTGCGTGATTGCAT (31)
2	dJ326J10	dJ326J10-SP6	ACTTGGAGGATTTATTIG (6)	ATACATAAGATAAAGAAATC (11)
	dJ739D18	dJ739D18-SP6	TAGCTGAAGCAATCTATT (34)	TTTTCCGTCTTTCCACAC (41)
	dJ756A17	dJ756A17-SP6	AGTATGCTGTGTGCCAG (9)	GAGGACTAGTGTGAGAAA (27)
	dJ373D24	dJ373D24-SP6	AGTAGACACGGGTATCAG (8)	CCACCTCCAAATCCTGAC (16)
3	dJ369D13	dJ369D13-T7	CGGCCTTAAAATCTGATA (19)	CTCAATACTGGATCTGTG (20)
	dJ142A6	dJ142A6-SP6	AGTATGGCAGACTTGATG (10)	ATGAATGGGACAAACTTC (14)
		dJ142A6-T7	CTGGGCAAGCTAATTTTG (23)	TCTGGACGTACTCTGTTC (35)
	dJ345P21	dJ345P21-T7	CCCTCACCCACACTTCAC (17)	TTTCCTGCGTGTGGCCTC (40)

3rd

コンティグ	PACクローン	プライマーセット	シーケンス(F) 5'-3' (配列番号)	シーケンス(R) 5'-3' (配列番号)
1	dJ587C9	dJ587C9-T7	ATATTGCAGACTGAACAG (12)	AAGCAGTTTCCCCATAA (3)

【0056】

新たに設計したプライマーセットを用いて再度PAC DNA poolから

前記 1 s t スクリーニングにより得られた合計 18 クローンは NB-1 及び M A S S - N B - S C H - 1 の 2 株において欠失した領域のゲノムシーケンスを保持していると考えられ、複数のプライマーセットにより検出されるものがあることから、おおまかなコンティグを 3 つ形成した（それぞれをコンティグ 1、コンティグ 2、コンティグ 3 とする）。1 s t スクリーニングによって得られた 18 の P A C クローンのコンティグを図 4 に示す。

【0053】

コンティグ 1 から d J 9 9 E 2 3、d J 3 7 1 E 1 の 2 クローン、コンティグ 2 から d J 3 2 6 J 1 0、d J 7 3 9 D 1 8、d J 7 5 6 A 1 7、d J 3 7 3 D 2 4 の 4 クローン、コンティグ 3 から d J 3 6 9 D 1 3、d J 1 4 2 A 6、d J 3 4 5 P 2 1 の 3 クローン、合計 9 クローンの P A C について両末端の塩基配列を R P N 2 4 3 4（キット：アマシャム社製）を用いて以下の方法により決定した。2 μ g の P A C DNA、6 p m o l の S P 6 または T 7 プライマー、2 μ l の A、C、G、T の各試薬の混合液（キット付属品）に滅菌蒸留水を加えてトータル 6 μ l の混合液を調製する。この混合液を 95℃ で 2 分間変性させた後、95℃ で 30 秒間、50℃ で 30 秒間、72℃ で 1 分間を 1 サイクルとして 30 サイクル繰り返し P C R 反応を行った。反応液に 5 μ l の反応停止液（キット付属品）を加え、さらに 95℃ で 2 分間変性させ氷冷し、6% のアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、シーケンスした。得られた塩基配列情報から新たにウォーキングプライマーを 10 セット設計した。

【0054】

表 4 に選抜したクローンとそれぞれのプライマーセットのシーケンスを示す。

【0055】

【表 3】

1stスクリーニングにより得られた18個のPACクローンとそのコンティグ
太字は複数のプライマーにより検出されたクローン

プライマーセット	得られたPACクローン	コンティグ
SGC-30343	dJ99E23、dJ371E1、dJ310M20	1
D1S2021	dJ326J10、dJ694C14、dJ736L20、dJ739D18、dJ739F17、dJ756A17	2
D1S1768	dJ266I16、dJ326J10、dJ373D24	
PGD	dJ92K14、dJ266I16、dJ373D24、dJ585H7、dJ686A20	
D1S244	dJ142A6、dJ332G17、dJ345P21、dJ369D13	3
D1S2736	dJ142A6、dJ345P21、dJ369D13	

【0052】

その結果を図3に示す。dJ142A6、dJ332G17、dJ345P21、dJ369D13の4つのPACクローンにおいて、285～296塩基付近に増幅されるバンドが観察された。図3にはdJ142A6、dJ332G17、dJ369D13のみの結果を示す。

【0049】

同様にして、1p36.23-31領域の欠失を確認した他のプライマーセットSHGC-31453、SGC-30343、D1S2021、D1S1768、PGD、D1S2736によるスクリーニングを行った結果、SHGC-31453を除く5つのプライマーセットで増幅が観察されたものが14クローン単離された。

【0050】

以上により得られたクローンを1stスクリーニングとした。1stスクリーニングにより得られた18クローンを表3に示す。

【0051】

検出されたが、1 p 3 6. 2 3 - 3 1 領域内で増幅が予想されるバンドが観察されなかった。

【0043】

以上の結果から、ヒト神経芽細胞腫株であるNB-1及びMASS-NB-SCH-1は1 p 3 6の少なくともSGC-30343からD1S2736で規定される領域に両染色体の欠失を有するものと判断された。

【0044】

(実施例5) 欠失領域のシーケンスを含むPACクロンの選択

実施例3で1 p 3 6. 2 3 - 3 1 領域の欠失を確認したプライマーセットD1S244を用いて、ヒトゲノムをランダムに有するPACクロン (P1-derived artificial chromosome: オリゴサービスつくば研究所製) をLA PCR kit (宝酒造社製) を用いて以下の方法でPCRを行い、欠失領域のシーケンスを含むPACクロンの選択を行った。

【0045】

5 μ l のPAC DNA pool 溶液 (Z1~Z4: オリゴサービスつくば研究所製)、2 μ l の10xLA PCR buffer、2.5 μ l のdNTPs (2mM)、0.4 μ l のD1S244F (100 pmole/ μ l)、0.4 μ l のD1S244R (100 pmole/ μ l)、9.6 μ l の滅菌蒸留水、および0.1 μ l のLA taq (5u/ μ l) を混合し20 μ l の混合液を調製した。

【0046】

混合液を94℃で3分間変性させた後、94℃で30秒間、56℃で30秒間、72℃で1分間を1サイクルとして35サイクル繰り返しさらに72℃で5分間放置しPCR反応を行った。

【0047】

このPCR反応物を電気泳動し、285~296塩基付近に増幅されるバンドが観察されたPAC DNA pool についてのみ同様の方法でさらに2度PCRを行いクロンの絞り込みを行った。

【0048】

【表 2】

SHGC-31453、SGC-30343、D1S2021、D1S1768、PGD、D1S2736のシーケンス

プライマーセット	シーケンス(F) 5'-3' (配列番号)	シーケンス(R) 5'-3' (配列番号)	増幅サイズ
SHGC-31453	AAACCTCAGCAGTGGTCCTG(2)	AAACCCCTCTTCTTAGAGTGACG(1)	129bp付近
SGC-30343	GTGTTGGAGGGCCAAATGTG(32)	TTGACCGTGTTTGTCACTTAA(39)	131bp付近
D1S2021	GTGAAGAGCCAGAGATGTCC(30)	CATAGTGCCACACGCAAG(15)	190bp付近
D1S1768	ATCTGATGTTGGAGCTTGAG(13)	ACTAACAGCTCCGTGACGC(5)	147bp付近
PGD	TTCAGTTGATCAGAGTGCG(38)	ACCAGGAGCTGCTCATGTG(4)	131bp付近
D1S2736	CCTCCAGGGTATTCTTGG(18)	TTTTGAGGTGTGAGAGCAG(42)	130bp付近

【0 0 4 2】

この結果(図2)、陽性対照であるhNGFβでは増幅が予想されるバンドは

付近のプライマーで、それぞれ253bp、229bp付近にバンドが増幅される。これらのプライマーのシーケンスを表2に示す。

【0041】

【 0 0 3 6 】

D 1 S 5 4 8 は D 1 S 2 4 4 より 1. 3 M b 染色体のテロメア側を増幅する。
F 及び R はプライマーの方向を示している。

【 0 0 3 7 】

ここで、1 p 3 6. 2 3 - 3 1 領域内に全く欠失が存在しない場合、D 1 S 5 4 8 によって 1 6 7 塩基付近、D 1 S 2 4 4 によって 2 8 5 ~ 2 9 6 塩基付近に増幅されたバンドが観察される。また本発明により特定された 1 p 3 6. 2 3 - 3 1 領域内に欠失が存在する場合、D 1 S 5 4 8 によって 1 6 7 塩基付近のバンドは観察されるが、D 1 S 2 4 4 によって 2 8 5 ~ 2 9 6 塩基付近で増幅されたバンドは観察されない。

【 0 0 3 8 】

前記混合液を 9 6 ° C で 3 分間変性させたあと、9 4 ° C で 3 0 秒間、5 6 ° C で 4 5 秒間、7 2 ° C で 1 分間を 1 サイクルとして 3 0 サイクル繰り返し、最後に 7 2 ° C で 1 0 分間インキュベートして P C R 反応を行った。得られた P C R 反応物を 4 % のアガロースゲルを用いて電気泳動した。得られた結果を図 1 に示す。

【 0 0 3 9 】

陽性コントロールのプライマーセットである D 1 S 5 4 8 によって増幅される 1 6 9 塩基付近のバンドは全ての細胞株で観察された。それに対して D 1 S 2 4 4 によって増幅される 2 8 5 ~ 2 9 6 塩基付近のバンドは N B - 1 及び M A S S - N B - S C H - 1 株においてのみ観察されなかった。

【 0 0 4 0 】

(実施例 4)

そこで N B - 1 及び M A S S - N B - S C H - 1 の 2 株において 1 p 3 6. 2 3 - 3 1 領域内を特異的に増幅することが知られている他の 5 つのプライマーセット S G C - 3 0 3 4 3、D 1 S 2 0 2 1、D 1 S 1 7 6 8、P G D、D 1 S 2 7 3 6 についてもそれぞれ P C R を行った。陽性対照としてヒト 1 番染色体短腕 1 3 位 (1 p 1 3) に位置するヒト神経成長因子 (human Nerve Growth Factor β : hNGF β) を 2 種類用いた。hNGF β 6 0 s はアニーリング温度が 6 0 ° C 付近、hNGF β 5 7 s はアニーリング温度が 5 7 ° C

【表1】

D1S548及びD1S244のシーケンス

プライマーセット	シーケンス(F) 5'-3'	(配列番号)	シーケンス(R) 5'-3'	(配列番号)	染色体の位置	増幅サイズ
D1S548	GAAGTCATTGGCAAAAGGAA (25)		GCCTCTTTGTTGCAGTGATT (28)		1p36.23-31	167bp付近
D1S244	GAGCAGCACCGTACAAAT (26)		AGCTCCGCTCCCTGTAAT (7)		1p36.23-31	285-296bp付近

実施例 1、2 で抽出、精製した 27 種類のヒト神経芽細胞腫由来細胞株からの細胞のゲノム DNA を用いて、1 p 36 の欠失を以下に示すような部位特異的 PCR により同定した。また、使用した PCR プライマーは特に記載されない限り、サワディーテクノロジー社製のものを用了。

【0033】

1 μ l のゲノム DNA 溶液 (2 ng / μ l)、1 μ l の 10x Pfu buffer、1 μ l の dNTPs (2 mM)、0.2 μ l の D1S548F (20 pmole / μ l)、0.2 μ l の D1S548R (20 pmole / μ l)、0.2 μ l の D1S244F (20 pmole / μ l)、0.2 μ l の D1S244R (20 pmole / μ l)、6.12 μ l の滅菌蒸留水、および 0.08 μ l の Pfu を混合し 10 μ l の混合液を調製した。

【0034】

ここで D1S548 および D1S244 はともに 1 p 36.23-31 領域内を特異的に増幅することが可能な既知のプライマーセットであり、それらのシーケンスを表 1 に示す。

【0035】

を加えて1時間混和したあと、3, 0 0 0 r p mで10分遠心して上清を回収した。

【0027】

回収した上清にあらかじめ-20℃で保冷した10. 2 mlのエタノールを加えて混和し、得られる糸状のDNAをパスツールピペットでとり、余分のエタノールを取り除いて乾燥させた。乾燥させたDNAに適量のTE buffer (Tris-Cl (pH 8. 0)、1 mM EDTA)を加え、室温で1~2日混和してDNAを溶解した。

【0028】

(実施例2) ヒト神経芽腫細胞株から抽出したゲノムDNAの精製

ヒト神経芽腫細胞株から抽出したゲノムDNAをQIA amp Blood kit (QIAGEN社製)を用いて以下に示す条件で精製した。

【0029】

抽出したゲノムDNAを260 nmの紫外光の吸収により定量し、5~10 μ gのDNAに適量のTE bufferを加え225 μ lとした。さらにエタノールを210 μ l加え攪拌した。

【0030】

攪拌液を付属のQIA ampカラム(キット付属品、QIAGEN社製)に移し8000 r p mで1分間遠心しゲノムDNAをカラムに吸着させた。カラムに500 μ lのBuffer AW(キット付属品、QIAGEN社製)を加えて8000 r p mで1分間遠心した。さらにbuffer AWをいれて1500 r p mで3分間遠心したあと、カラムを1. 5 mlの新しいチューブへ移し、あらかじめ70℃に暖めておいたbuffer AEを200 μ l加え、室温で1分間放置後、8000 r p mで1分間遠心しDNAを精製した。

【0031】

260 nmの紫外光の吸収により精製したゲノムDNAを定量した。

【0032】

(実施例3) ヒト神経芽腫細胞ゲノムDNAを用いた1 p 3 6部位特異的PCRによる欠失株の同定

CHP901:患者の手術摘出標本から細胞株樹立した
 SY5Y:Garrett M Brodeurより供与
 GANB:患者の手術摘出標本から細胞株樹立した
 SK-N-AS(ATCC Number:CRL-2137)
 KAN:Garrett M Brodeurより供与
 LHN:Garrett M Brodeurより供与
 SAN:Garrett M Brodeurより供与
 TGW:Garrett M Brodeurより供与
 MASS-NB-SCH-1:静岡県立こども病院臨床病理科の平岩久幸先生より供与。Cancer 79, 2036-2044 (1997)
 KP-N-NB:京都府立医科大学小児科の松村隆文先生より供与
 NB69(理研細胞バンク:RC0480)
 NBTu-1:日赤医療センター小児外科の横森欣次先生より供与
 SK-N-MC(ATCC Number:HTB-10)
 SK-N-SH(ATCC Number:HTB-11)。

【0024】

得られたコンフルエントの培養皿2枚を用いてトリプシン処理により細胞を摂取した。摂取した細胞を5mlのTEN buffer(TEN:50mM Tris-Cl(pH8.0)、1mM EDTA、100mM NaCl)中に懸濁しホモジナイズした。ホモジナイズした懸濁液に750 μ lのSDS(10%)と125 μ lのproteinase K(MERCK社製、20mg/ml)を加え、緩やかに転倒混和し、50℃で一晩インキュベートして細胞を溶解させた。

【0025】

翌日、5.1mlの飽和フェノールを加え、1時間混和し10,000rpmで10分遠心して上清を回収した。さらにもう一度、3,000rpmで10分遠心して上清を回収した。

【0026】

回収した上清に5.1mlのクロロホルム:イソアミルアルコール=24:1

が可能である。これら細胞と正常細胞の蛋白質を抽出し、例えばウエスタンブロッティングにより正常細胞でのみ発現している蛋白質を同定することが可能である。その蛋白質を用いて例えばアフィニティークロマトグラフィーにより特異的に相互作用する別の蛋白質の同定も可能である。これらの手法を繰り返すことにより発癌に関する蛋白質の同定しその細胞内における機能を解析することで腫瘍病体メカニズムの解析が可能である。

【0022】

以下、本発明により見いだされた神経芽細胞腫に共通の 1 p 3 6 のホモ接合性欠失領域について、実施例に即してさらに詳しく説明する。

【0023】

【実施例】

(実施例 1) ヒト神経芽細胞腫からのゲノム DNA の抽出

以下のヒト神経芽細胞腫由来の細胞株をそれぞれ 1 0 c m の培養皿でほぼコンフルエントになるように培養した。ここで使用した各細胞名とその入手方法を以下にまとめた。

SK-N-BE (ATCC Number: CRL-2271)

SK-N-DZ (ATCC Number: CRL-2149)

RT-BM1

NLF: Garrett M Brodeur より供与

LA-N-5: (理研細胞バンク: RC0485)

IMR32: Garrett M Brodeur より供与

NMB: Garrett M Brodeur より供与

OAN: Garrett M Brodeur より供与

NGP: Garrett M Brodeur より供与

NB1: 京都府立医科大学小児科の松村隆文先生より供与 (新潟大学脳研究所で樹立された日本で最も古い神経芽細胞腫細胞株うちのひとつと言われている)

CHP134: Garrett M Brodeur より供与

KCN: Garrett M Brodeur より供与

NBL-S: Garrett M Brodeur より供与

予後が不良であると診断することが可能である。ハイブリダイズさせる方法としては例えば、サザンブロットィング、ノザンブロットィング、ドットブロットィング、Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法などが使用できる。

【0019】

欠失領域の有無を調べるには、他にも1p36ホモ接合性欠失領域の任意の配列をプライマーとしてPolymerase Chain Reaction (PCR) 法を用いることにより可能である。

【0020】

ヘテロ接合性の喪失を同定するには、例えばRestriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法を用いることにより可能である。

【0021】

このような方法は当事者にとって周知の方法によって行われる。例えば、Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL (T. Maniatis 著: Cold Spring Harbor Laboratory Press 社)、遺伝子病入門 (高久史磨 著: 南江堂) を参照。

(2) 抗癌剤の開発

本発明により開示された塩基配列をもちいて1p36ホモ接合性欠失あるいはヘテロ接合性の消失を有する細胞を見だし、抗癌剤のスクリーニングが可能である。これらの細胞は癌化しているため、細胞の分裂増殖が正常細胞に比較して早い。細胞の培養液中に抗癌剤の候補物質を添加し細胞の分裂増殖速度を観察することで1p36ホモ接合性欠失あるいはヘテロ接合性の消失を有する腫瘍の抗癌剤がスクリーニングできる。細胞の分裂増殖速度は例えば、ラジオアイソトープ (例えばトリチウム) ラベルしたチミジンの取り込み量を測定することにより可能である。

(3) 腫瘍病体メカニズムの解析方法

本発明により開示された塩基配列をもちいて1p36ホモ接合性欠失あるいはヘテロ接合性の消失を有する細胞を見だし、腫瘍病体メカニズムの解析する事

。ここでLOHとは、一方のコピーに小さな遺伝子異常（塩基、遺伝子の一部の欠失や置換）が存在し、もう一方のコピーが存在する染色体はその遺伝子を含んだ大きな領域がそっくり欠失するパターンを意味する。従って、癌抑制遺伝子の不活性化により癌が発症した患者では、癌抑制遺伝子が存在する染色体が正常細胞では2コピー、腫瘍細胞では1コピーになっていると考えられている。

【0016】

しかし通常観察される前記LOHの範囲は、分子遺伝子学的距離としてはきわめて長大で、その中に含まれる遺伝子の数及び塩基数は非常に膨大である。実際現在1 p 3 6の欠失領域は、LOHの解析により1 p 3 6、2 - 1 p 3 6、3の約8～10Mbに狭められてはいるが、さらに領域の絞り込みが必要である。

【0017】

そこで、本発明者らは、癌抑制遺伝子の同定のために、神経芽細胞腫瘍の細胞株を解析した結果、神経芽細胞腫瘍の染色体1 p 3 6に約700kbのホモ接合性欠失部分が認められることを見出した。さらにこの700kbは、ヘテロ接合性の喪失の解析により明らかにされていた欠失領域（約8～10Mb）の一部であった。

【0018】

（ヒト神経芽細胞腫1 p 3 6ホモ接合性欠失領域に関する応用例）

（1）腫瘍の遺伝子診断、予後同定の方法およびそのために使用可能な腫瘍マーカー

本発明により開示された塩基配列をもちいて試料細胞中の1 p 3 6ホモ接合性欠失領域の有無を調べることにより、腫瘍の診断、予後同定が可能である。欠失領域の有無を調べるには、例えば1 p 3 6ホモ接合性欠失領域の任意の配列とハイブリダイズし得る塩基配列（プローブ）を使用する全ての方法が提供される。これらのプローブは、必要に応じてラジオアイソトープ、酵素（例えばアルカリフォスファターゼ、ペルオキシターゼ）、蛍光化合物（例えばフルオレセイン）、あるいは化学発光化合物（例えばアクリジニウムエステル、イソルミノール）等で標識される。すなわち試料細胞中にプローブ配列とハイブリダイズする核酸が存在しない場合、腫瘍発症の可能性が高く、既に腫瘍を発症している検体では

【0013】

また、本発明は、前記領域から得られる塩基配列情報に基づく、腫瘍マーカー、腫瘍の診断試薬、腫瘍の予後同定試薬、及び抗癌剤を含むものである。

さらに、本発明は、前記領域の塩基配列情報に基づく、腫瘍病体メカニズムの解析方法、及び腫瘍病体メカニズムの解析試薬を含むものである。

【0014】

【発明の実施の形態】

(1 p 3 6における新規ホモ接合性欠失領域)

本発明者等は、(1) ヒト1 p 3 6の欠失は、少なくとも14種類のヒト腫瘍(大腸癌、乳癌、脳腫瘍など)において見出されており、さらにこの領域に複数個のがん抑制遺伝子が存在することが予測され、その欠失は神経芽細胞腫の予後の不良さと高い相関を示すこと(Schwab M. 等、Genes Chromosomes Cancer 16, 211-229 (1996)、Fong C. T. 等、Cancer Res. 52, 1780-1785 (1992))に注目し、また、大腸癌において正常1 p 3 6を導入することで癌細胞の正常化が認められること(Tanaka K. 等、Oncogene 8, 2253-2258 (1993))、肝癌や大腸癌において1 p 3 6の欠失は癌の初期段階から認められること(Kuroki T. 等、Genes Chromosomes Cancer 13, 163-167 (1995))に注目し、1 p 3 6の欠失が正常細胞の癌化の初期に関与する可能性が高いと考えた。

【0015】

さらに、癌抑制遺伝子の同定はヘテロ接合性の喪失(Loss Of Heterozygosity: 以下LOHともいう)の解析により可能である。すなわち性染色体を除くヒト細胞の染色体は全て対になって存在し、遺伝子も母方からと父方からの2つのコピーが存在する。ここでKundson A. G. 等が提唱した“two-hit theory”(Kundson A. G., Pediatr Res 10, 513-(1976))によると、遺伝子の不活性は母方、父方の2つのコピーが両方とも不活性化した場合にのみ観察されることとなるが、このメカニズムでもっともよく観察されるのが前記LOHである

また、該塩基配列情報に基づき、遺伝子診断方法、抗癌剤の開発、腫瘍病体メカニズムの解析方法、腫瘍病体メカニズムの解析に用いる試薬の開発を提供することを目的とする。

【 0 0 0 7 】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、神経芽細胞腫の癌抑制遺伝子を見いだすべく鋭意研究した結果、ヒト神経芽細胞腫の細胞株であるNB-1の第1番染色体短腕36位において、新規なホモ接合性欠失領域を見いだした。

【 0 0 0 8 】

かかる知見に基づき、腫瘍の診断、予後同定の方法およびそのために使用可能な腫瘍マーカーを設計することを可能とし、本発明を完成した。さらに、該領域の塩基配列情報に基づき、腫瘍の遺伝子診断方法、抗癌剤の開発、腫瘍病体メカニズムの解析方法、腫瘍病体メカニズムの解析に用いる試薬の開発を可能とし本発明を完成した。

【 0 0 0 9 】

より詳しくは、本発明は、ヒト神経芽細胞腫の第1番染色体短腕36位に共通に存在するホモ接合性欠失領域にかかるものである。

【 0 0 1 0 】

より詳しくは、前記領域が、少なくともPACクローンであるdJ1028013のSP6側プライマーセットとPACクローンであるdJ371E1のSP6側プライマーセットとの間から、プライマーセットD1S2736とPACクローンであるdJ142A6のT7側プライマーセットとの間で規定されることを特徴とする領域にかかるものである。

【 0 0 1 1 】

また、前記領域が、さらに少なくともプライマーセットSGC30343およびD1S2736で規定されることを特徴とする領域にかかるものである。

【 0 0 1 2 】

また、前記領域がヒト細胞芽細胞種の細胞株NB-1及びMASS-NB-SC H-1株で欠失していることを特徴とする領域にかかるものである。

R B 遺伝子は小児の眼の癌である網膜芽細胞腫 (R e t i n o b l a s t o m a) の原因となる遺伝子として発見されたためこの名が付けられた。網膜芽細胞腫ではヒト第 13 染色体長腕 14 領域 (13 q 14) が短くなっていることが多く (Y u n i s J J. 等 A m. J. D i s. C h i l d. 132, 161-163 (1978))、この部分にある遺伝子が失活すると癌になりやすくなるのではないかと以前から推定されていた。しかし遺伝子のクローニングは難しく、1986 年になってヒトの癌抑制遺伝子としては初めて R B が同定されるに至った。(F r i e n d S H. 等 N a t u r e 323, 643-646 (1986))

ウィルムス腫瘍 (W i l m s' T u m o r) は小児の後腎造腎組織より発生する胎児性悪性腫瘍で、腎芽腫とも呼ばれる。患者はしばしば泌尿生殖器の異常を伴うが、疫学的データから網膜芽細胞腫と同様に "T w o - h i t - t h e o r y" が適用できるとされ、劣性型の腫瘍遺伝子の関与が推定されていた。腫瘍 (W) と泌尿生殖器 (G) の異常に加えて、無虹彩症 (A) と精神発達遅滞 (R) を伴う W A G R 症候群の患者で第 11 番染色体短腕 13 領域 (11 p 13) に微少な欠失がしばしば認められる。この共通欠失領域に位置する遺伝子として W T 1 が単離された (C a l l K M. 等 C e l l 60, 509-520 (1990))。

【0004】

その後も染色体の欠失領域の情報を元に多くの癌抑制遺伝子が発見されたが、1 p 36 の欠失領域から神経芽細胞腫の癌抑制遺伝子は現在もなお同定されるに至っていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ヒト神経芽細胞腫に共通に存在する第 1 番染色体短腕 36 位の新規なホモ接合性欠失領域に関する情報を提供することを目的とする。

【0006】

さらに、該領域の塩基配列情報に基づき、腫瘍の診断、予後同定の方法およびそのために使用可能な腫瘍マーカーを提供することを目的とするものである。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒト 1 p 3 6 ホモ接合性欠失領域

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト神経芽細胞腫の第 1 番染色体短腕 3 6 位 (1 p 3 6) に共通に存在するホモ接合性欠失 (H o m o z y g o u s D e l e t i o n) 領域。

【請求項 2】 少なくとも PAC クローンである d J 1 0 2 8 O 1 3 の SP 6 側プライマーセットと PAC クローンである d J 3 7 1 E 1 の SP 6 側プライマーセットとの間から、プライマーセット D 1 S 2 7 3 6 と PAC クローンである d J 1 4 2 A 6 の T 7 側プライマーセットとの間で、規定されることを特徴とする請求項 1 に記載の領域。

【請求項 3】 前記領域が、さらに少なくともプライマーセット S G C 3 0 3 4 3 および D 1 S 2 7 3 6 で規定されることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の領域。

【請求項 4】 ヒト神経芽細胞腫の細胞株 N B - 1 及び M A S S - N B - S C H - 1 株において欠失していることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の領域。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒト神経芽細胞腫の第 1 番染色体短腕 3 6 位 (以下、1 p 3 6 とともいう) に共通に存在するホモ接合性欠失 (H o m o z y g o u s D e l e t i o n) 領域 (以下、単に欠失領域ともいう) に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

発癌に関与している癌関連遺伝子には、不活性化されて発癌を促す癌抑制遺伝子が存在することが知られており、例えば R B または W T - 1 という癌抑制遺伝子がすでに見いだされ同定されている。

【0 0 0 3】

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0001746

【包括委任状番号】 9911698

【プルーフの要否】 要

【書類名】 特許願

【整理番号】 HMS847

【提出日】 平成12年 5月 9日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00
C07H 21/00

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区仁戸名町 6 6 2 番 2 号 医師住宅 2
 0 3

 【氏名】 中川原 章

【特許出願人】

 【識別番号】 000160522

 【氏名又は名称】 久光製薬株式会社

【特許出願人】

 【識別番号】 591014710

 【氏名又は名称】 千葉県

【代理人】

 【識別番号】 100088155

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 長谷川 芳樹

【選任した代理人】

 【識別番号】 100107191

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 長濱 範明

【先の出願に基づく優先権主張】

 【出願番号】 平成11年特許願第245962号

 【出願日】 平成11年 8月31日

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 014708

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

31.08.00	
RECD 20 OCT 2001	
WIPO	PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

2000年 5月 9日

出 願 番 号
Application Number:

特願2000-136266

出 願 人
Applicant(s):

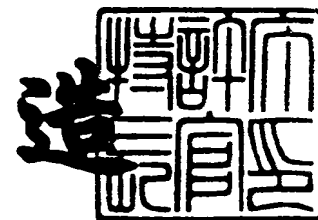
久光製薬株式会社
千葉県

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月 6日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3080945